

RADIOIMMUNTESTS FÜR DIE BESTIMMUNG
VON INDOLALKALOIDEN

DISSERTATION

zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Hans Arens
Bochum 1979

RADIOIMMUNTESTS FÜR DIE BESTIMMUNG
VON INDOLALKALOIDEN

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der

Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Hans Arens

Bochum 1979



1. Referent: Prof. Dr. M. H. Zenk
2. Referent: Prof. Dr. K. Altendorf

Eingereicht am: 18.6.1979

Tag der mündlichen Prüfung: ..23.8.1979.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	12
1. Pilz und Pflanzenmaterial	12
1.1 Herkunft und Anzucht von <u>Catharanthus roseus</u> G. DON Pflanzen	12
1.2 Herkunft und Anzucht von <u>Rauwolfia</u> Pflanzen und Anlage von <u>R. vomitoria</u> (Afz.) Gewebe- kulturen	13
1.3 Herkunft von <u>Claviceps purpurea</u> (Fries) Tulasne Sklerotien	14
1.4 Anzucht von Roggen im Freiland und in der Phytokammer	15
1.5 Anlage von parasitischen Mutterkornkulturen	17
1.6 Anlage von saprophytischen Mutterkornkulturen	18
2. Versuchstiere	22
3. Reagentien	23
4. Radiochemikalien	24
5. Dünnschichtchromatographische Bestimmungen von Ajmalin und Ergotalkaloiden	26
6. Erzeugung von Antikörpern	27
7. Durchführung und Automatisierung der RIA's	29
8. Berechnung radioimmunologischer Ergebnisse	32
III. Ergebnisse	33
1. Anwendung der Radiimmunoassays für Serpentin und Raubasin (Ajmalicin)	33
1.1 Selektion von <u>C. roseus</u> Pflanzen mit hohem Alkaloidgehalt	33
1.1.1 Verteilung von Serpentin und Raubasin in einer 6 Monate alten <u>C. roseus</u> Pflanze	34
1.1.2 Kinetik des Serpentin- und Raubasinge- haltes in <u>C. roseus</u> Pflanzen	35
1.1.3 Ergebnisse der durchgeführten Selektions- untersuchungen	35

	<u>Seite</u>
2. Aufbau eines Radioimmunoassays für Ajmalin	39
2.1 Herstellung des Ajmalininimmunogens	39
2.2 Wahl geeigneter Testbedingungen zur radioimmunologischen Bestimmung von Ajmalin	43
2.2.1 Optimierung der Antigen-Antikörperreaktion	43
2.2.2 Auswahl und Optimierung der Trenntechnik	45
2.3 Charakterisierung der Antiseren	47
2.4 Standardisierung des Tests	52
2.5 Untersuchungen zur Spezifität des Tests	55
2.5.1 Bestimmung von Kreuzreaktionen der Ajmalinantikörper gegen andere Indolalkaloide	56
2.5.2 Bestimmung der Verteilung von immunreaktivem Material auf dem Chromatogramm eines <u>R. vomitoria</u> Wurzel- und Stengel-extraktes	59
2.5.3 Korrelation von RIA Bestimmungen und Messungen mit dem Zeiss Spektralphotometer KM3	61
3. Anwendung des Radioimmunoassays für Ajmalin	62
3.1 Verteilung von Ajmalin in <u>R. vomitoria</u> und anderen <u>Rauwolfia</u> Arten	62
3.2 Optimierung des Ajmalingehaltes von <u>Rauwolfia vomitoria</u> Gewebekulturen	65
4. Aufbau der Ergotamin- und Ergocristin Radioimmunoassays	70
4.1 Synthese der Ergotamin- und Ergocristin Immungene	70
4.2 Wahl geeigneter Testbedingungen zur radioimmunologischen Bestimmung von Ergotamin und Ergocristin	72
4.2.1 Optimierung der Antigen-Antikörperreaktion	73
4.2.2 Optimierung der Trennmethode	75
4.3 Charakterisierung der Antiseren	76

	<u>Seite</u>
4.4 Standardisierung der Tests	78
4.5 Untersuchung der Spezifität der Tests	80
4.5.1 Bestimmung der Kreuzreaktion der Antikörper gegen andere Ergotalkaloide	80
4.5.2 Bestimmung der Verteilung von immunreak- tivem Material auf dem Chromatogramm von Sklerotienextrakten	88
4.5.3 Korrelation von radioimmunologischen und fluorimetrischen Bestimmungen	91
5. Aufbau von Radioimmunoassays für Lysergsäure und einfache Lysergsäurederivate	93
5.1 Herstellung von markierter Lysergsäure	93
5.1.1 Synthese von ^3H Lysergsäure	94
5.1.2 Synthese von ^{125}J -Tyramin Lysergsäure	95
5.2 Herstellung der Lysergsäure Immunogene	100
5.3 Wahl geeigneter Testbedingungen zur radioimmu- nologischen Bestimmung von Lysergsäure und einfachen Lysergsäurederivaten wie Ergometrin	102
5.4 Charakterisierung der Antiseren	103
5.5 Standardisierung der Tests	106
5.6 Untersuchung der Spezifität der Tests	109
5.6.1 Bestimmung der Kreuzreaktionen der Anti- körper gegen andere Ergotalkaloide	109
5.6.2 Bestimmung der Verteilung von immun- reaktivem Material auf einem Chromato- gramm eines <u>C. purpurea</u> Submerskultur- filtrates	111
6. Anwendung der RIA's für Ergotalkaloide	114
6.1 Selektionsuntersuchungen an Sklerotien ver- schiedener <u>C. purpurea</u> Herkünfte	115
6.1.1 Methode für die Extraktion der Alkaloide aus Sklerotien	115
6.1.2 Untersuchungen zur Verteilung von Ergo- tamin und Ergocristin in <u>C. purpurea</u> Sklerotien	117

	<u>Seite</u>
6.1.3 Untersuchung des Alkaloidgehaltes von Sklerotien verschiedener Herkünfte	120
6.2 Selektionsuntersuchungen an kultivierten <u>C. purpurea</u> Stämmen	124
6.2.1 Kinetik der Ergotaminbildung in <u>C. purpurea</u> Sklerotien	125
6.2.2 Optimierung der Impftechnik	127
6.2.3 Abhängigkeit des Alkaloidgehaltes von der Wirtspflanze	130
6.2.4 Ergebnisse der Selektionsuntersuchungen an kultivierten Sklerotien	131
6.3 Züchtung von Sklerotien mit neuem Alkaloidspektrum	137
6.4 Optimierung der saprophytischen Kultivierung des Stammes 202	140
6.4.1 Optimierung des Inoculum	141
6.4.2 Kinetik der Alkaloidbildung in Submerskulturen	146
6.4.3 Optimierung des Mediums	147
6.4.4 Optimierung der Anzuchtbedingungen	153
6.5 Versuche zur Selektion von Hochleistungsstämmen für die saprophytische Alkaloiderzeugung	156
6.5.1 Selektion auf alkaloidreiche Myzelisolate des Stammes 202	156
6.5.2 Versuche zur Steigerung der Alkaloidproduktion über Sklerotien des Stammes 202	159
IV. Diskussion	162
V. Zusammenfassung	172
VI. Literaturverzeichnis	176

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

B	antikörpergebundene Fraktion des markierten Antigens
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie (1 Ci = $2.22 \cdot 10^{12}$ dpm)
cpm	Zählrate (counts per minute)
DMF	Dimethylformamid
F	nicht-antikörpergebundene Fraktion des markierten Antigens
FG	Frischgewicht
KR	Kreuzreaktion
nm	Nanometer
P	Elterngeneration
r	Korrelationskoeffizient
s	Standardabweichung
S ₁ , S ₂ , S ₃	erste, zweite und dritte Selbstungsgeneration
Sp A	Spezifische Radioaktivität
TG	Trockengewicht
Ty-Lysergsäure	Tyramin-Lysergsäure
UB	unspezifische Bindung
V	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	Probenmittelwert



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

=====

Viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und davon abgeleitete Derivate finden auch heute noch trotz starker Konkurrenz durch synthetische Produkte große Anwendung bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten (Farnsworth, 1973). Einige der in diesem Zusammenhang wichtigsten Substanzen gehören zur Gruppe der Rauwolfia-, Catharanthus- und Ergotalkaloide, die alle den Indolalkaloiden zugeordnet werden.

Eines der bekanntesten Rauwolfia Alkaloide ist Ajmalin, das bisher in 22 verschiedenen Rauwolfia Arten nachgewiesen worden ist (Kähler, 1970). Die höchsten Ajmalinkonzentrationen sind in R. vomitoria (Afz.) festgestellt worden (Kähler, 1970). R. vomitoria ist ein kleiner Baum von 5 - 6 m Höhe, der im ganzen tropischen Afrika, vom Senegal über Zentralafrika bis nach Angola besonders in Galeriewäldern häufig anzutreffen ist. Darüber hinaus besitzen noch R. serpentina Benth. und R. tetraphylla L. größere Mengen dieses Alkaloids.

Sowohl in Rauwolfia (20 Arten) als auch in Catharanthus (4), Mitragyne (2), Pausinystalia (1) und Stemmadenia (1) Arten kommt Raubasin (Ajmalicin) vor (Gibbs, 1974). Die Substanz wird für industrielle Zwecke jedoch weniger aus diesen Pflanzen gewonnen als vielmehr durch die Reduktion von Serpentin, das in relativ hohen Konzentrationen in Catharanthus roseus G. Don Pflanzen enthalten ist. C. roseus ist eine immerblühende etwa 50 cm hoch werdende krautige Pflanze, die ursprünglich auf Madagaskar beheimatet war, als Zierpflanze aber weltweit verbreitet wurde.

Die Biosynthese des Raubasins erfolgt über Tryptamin und Secologanin, woraus Strictosidin entsteht (Stöckigt und Zenk, 1977). Aus dem Strictosidin wird über Cathenamin Raubasin gebildet (Stöckigt et al., 1977).

Raubasin hat eine breite Anwendung in der Behandlung von

Kreislaufferkrankungen gefunden. In der Kombination mit Reserpin oder Rescinnamin wird es zur Bekämpfung des Bluthochdruckes benutzt (Kähler, 1958). Darüber hinaus wird es aber auch zur Behandlung von Durchblutungsstörungen angewandt. Das ebenfalls in Rauwolfia Pflanzen vorkommende Ajmalin ist erstmals 1959 auf Grund seiner starken Herzwirkung zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen angewandt worden (Kleinsorge, 1959). Es verlängert die Refraktärphase des Myokards, worauf die verminderte Erregbarkeit des Myokards durch Reize beruht, die zu Extrasystolen und Flimmerarrhythmien führen.

Weiterhin finden einige Alkaloide aus der Gruppe der Ergotalkaloide große Anwendung bei der Behandlung verschiedenster Krankheiten. Die Ergotalkaloide umfassen die einfachen Lysergsäurederivate, die Peptidalkaloide und die Clavine. Die Clavine sind einfache Hydroxy- und Dehydroderivate des 6,8-Dimethylethylergolins (z.B. Elymoclavin, s. Tab. 18). Bei den einfachen Lysergsäurederivaten ist die Carboxylgruppe der Lysergsäure oder Isolysergsäure mit einfachen Bausteinen, bei den Peptidalkaloiden mit einem cyclischen Tripeptid verestert. Die Ergotalkaloide kommen in Claviceps Arten, in Aspergillus fumigatus (Spillsbury und Wilkinson, 1961), in Penicillium chermesinum (Agurell, 1964) und in weiteren Penicillium und Aspergillus Arten vor. In den beiden zuletzt genannten Gattungen wurden jedoch nur verschiedene Clavine, die teilweise in Claviceps Arten gar nicht vorkommen, entdeckt. Einfache Lysergsäurederivate und sogar Peptidalkaloide wurden dagegen in verschiedenen Convolvulaceen Gattungen und Arten nachgewiesen. Hofmann und Tschertter entdeckten 1960 in den Samen von Ipomoea violaceae L. und Rivea corymbosa (L.) Hall. Lysergsäureamid, Isolysergsäureamid und Chanoclavin. In den folgenden Jahren wurden viele verschiedene Ergotalkaloide in Ipomoea, Rivea, Argyreia und Strictocardia Arten entdeckt (vergl. Chao und Der Marderosian, 1973), darunter die Peptidalkaloide Ergosin und sein Isomer Ergosinin in Ipomoea argyrophylla Vatke (Stauffacher et al. 1965).

Das einfache Lysergsäurederivat Ergometrin (Ergonovin, Ergobasin) wurde in Ipomoea Species (Taber et al., 1963) sowie in chemischen Rassen von Claviceps paspali Stevens et Hall. (Kobel et al., 1964) und Claviceps purpurea nachgewiesen. Die Peptidalkaloide Ergotamin und Ergocristin kommen dagegen nur in verschiedenen chemischen Rassen von Claviceps purpurea vor.

Die Gattung Claviceps besteht aus 35 Arten, die weltweit verbreitet sind und sich streng organspezifisch in den Fruchtknoten verschiedener Grasarten entwickeln. Claviceps purpurea ist die in Europa bekannteste Claviceps Art, weil sie unter anderem Roggenpflanzen befällt und in den Ähren deutlich sichtbare Mutterkörner (Sklerotien) ausbildet. Der Entwicklungscyclus des Pilzes ist in Abb. 1 dargestellt.

Die Mutterkörner fallen im Sommer und Herbst nach der Reife des Roggens und anderer Grasarten auf den Boden, wo sie überwintern. Im Frühjahr entwickeln sich aus den Sklerotien zahlreiche Fruchtkörper (Perithechien), in denen die sexuelle Phase der Entwicklung abläuft. Auf dem Boden der Perithechien entstehen Büschel von langgezogenen, keulenförmigen Schläuchen (Asci), die jeweils acht Ascosporen enthalten. Diese werden aus den Asci nach der Reife ausgeschleudert und durch den Wind auf die Narben von Roggen- und anderen Grasblüten befördert, wo sie auskeimen und das Myzel der Nebenfruchtform (Sphacelia-Stadium) bilden (Primärinfektion). Das Myzel produziert durch ungeschlechtliche Teilung Millionen von Sporen, die zusammen mit Honigtau aus der Blüte ausgeschieden werden. Der Honigtau besteht aus zahlreichen Aminosäuren und Zuckern, weshalb er gern von Insekten gefressen wird. Durch die Insekten, die viele verschiedene Blüten anfliegen, werden die Sporen auf andere Roggenpflanzen oder Grasarten übertragen (Sekundärinfektion). Dabei besteht die Möglichkeit, daß Sporen verschiedener chemischer Rassen auf eine Narbe übertragen werden, dort auskeimen und gemeinsam das Sklerotium ausbilden. Weiterhin können Sporen durch die Be-



Abb. 1: Entwicklungscyclus von Claviceps purpurea
(aus Gröger, 1978).

rührung der sich im Winde bewegendenden Ähren übertragen werden. Aus dem infizierten Fruchtknoten entwickelt sich dann im Verlauf von mehreren Wochen das Mutterkorn, das aus dichtgepackten Pilzzellen mit Reservestoffen, vor allem Fettsäuren besteht.

Die Färbung der äußeren Schichten wird durch gelbliche und orangerote Farbstoffe, wie dem schwefelhaltigen Histidinabkömmling Ergothionein, gebildet (Gröger, 1978).

Das giftige Mutterkorn hat im Mittelalter weitverbreitete Seuchen verursacht, weil es zusammen mit Roggen zu Mehl verarbeitet wurde. Die Ergotismus genannte Krankheit äußerte sich in zwei Erscheinungsformen. Bei der einen traten starke Epilepsieanfälle auf (Ergotismus convulsivus), bei der anderen fielen mit der Zeit ohne Blutverlust die Gliedmaßen ab (Ergotismus gangraenosus). In der Medizin wurde das Mutterkorn

erst ab dem neunzehnten Jahrhundert als Wehenmittel benutzt. Die planmäßige klinische Anwendung und pharmakologische Untersuchung begann aber erst Anfang dieses Jahrhunderts.

Die Peptidalkaloide Ergotamin und Ergocristin haben ein vergleichbares Wirkungsspektrum, das in zentrale, neurohumorale und periphere Effekte eingeteilt werden kann (Hofmann, 1964). Der periphere Effekt äußert sich in Vasokonstriktion und Uteruskontraktion, auf der die klassische Anwendung des Mutterkorns als blutstillendes und wehenförderndes Medikament beruht. Die weitverbreitete Verwendung des Ergotamins zur Bekämpfung der Migräne ist auf die Vasokonstriktion zurückzuführen. Als neurohumorale Effekte sind der Adrenalin und Serotonin Antagonismus zu nennen, weshalb die Mutterkornpräparate als hochwirksame Sympathikolytika in der inneren Medizin eingesetzt werden und zum Beispiel die durch Adrenalin hervorgerufene Grundumsatzsteigerung aufheben können. Der zentrale Effekt beeinflusst das Vasomotorenzentrum im verlängerten Mark, wodurch die Gefäße erweitert und der Blutdruck gesenkt werden.

Durch die Hydrierung der Doppelbindung in 9,10 Stellung bei den Peptidalkaloiden ändert sich das Wirkungsspektrum völlig (Rothlin, 1949). Die klassischen Mutterkornwirkungen (Vasokonstriktion und Uteruskontraktion) werden stark abgeschwächt, und die zentralen Effekte mit Gefäßerweiterung und Blutdrucksenkung treten in den Vordergrund.

Das Wirkungsspektrum des Ergometrins unterscheidet sich von dem der Peptidalkaloide, was schon auf Grund der großen strukturellen Unterschiede erklärbar ist. Beim Ergometrin äußern sich nur die peripheren Effekte sehr stark. Deshalb wird es auch fast ausschließlich in der Geburtshilfe als Uteruskontraktionsmittel benutzt. Von Lysergsäure sind keine pharmakologischen Wirkungen bekannt, dagegen ist die halluzinogene Wirkung ihres synthetischen Derivates Lysergsäurediäthylamin (LSD) hinlänglich bekannt.

In der Biosynthesekette der Ergotalkaloide ist Agroclavin das erste Alkaloid mit vollständigem Ergolinskelett (Agurell und Ramstad, 1961). Agroclavin entsteht aus Chanoclavin I (Floss et al., 1967). Die komplizierten Einzelreaktionen zur Biosynthese des Chanoclavin I aus Tryptophan und Mevalonsäure sind zum großen Teil noch hypothetisch. Aus dem Agroclavin entsteht Elymoclavin, das die Schlüsselsubstanz für die Synthese der Lysergsäurederivate ist (Floss et al., 1966, Lin et al., 1973). Die Reaktionen vom Elymoclavin zu den einzelnen Lysergsäurederivaten sind noch nicht aufgeklärt.

Der Peptidteil von Ergotamin und Ergocristin wird aus den Aminosäuren Alanin, Phenylalanin und Prolin aufgebaut. Es ist jedoch noch nicht bekannt, mit welcher Aminosäure die Synthese beginnt und wie die Kette verlängert wird. Weiterhin ist der Mechanismus der Cyclolbildung unbekannt. Nach Floss et al. (1976) soll die Synthese an einem Multienzymkomplex ablaufen.

Der weltweite Bedarf an Peptidergotalkaloiden (ca. 4000 kg jährlich) und an einfachen Lysergsäurederivaten (ca. 12000 kg jährlich) wird durch die parasitische und saprophytische Kultivierung von C. purpurea und C. paspal Stämmen gedeckt. Die Alkaloide Ajmalin, Serpentin und Raubasin dagegen werden aus Wurzeln von wildwachsenden Rauwolfia Pflanzen und aus C. roseus Pflanzen isoliert, die für diese Zwecke angebaut werden.

Um den steigenden Bedarf an diesen Alkaloiden zu decken und von Importen unabhängig zu werden, wäre eine Gewinnung dieser Substanzen aus Catharanthus oder Rauwolfia Zellsuspensionskulturen vorteilhaft. Es ist bereits gelungen, in C. roseus Gewebekulturen hohe Serpentin- und Raubasinkonzentrationen zu erzeugen (Zenk et al., 1977). Die Gehalte sind jedoch für eine industrielle Ausbeute noch um einen Faktor 2 zu niedrig.

Es stehen zwei prinzipielle Methoden zur Verfügung, um die Alkaloidbildung in Catharanthus- und Rauwolfia Pflanzen

in Gewebekulturen sowie in parasitischen und saprophytischen Mutterkornkulturen zu erhöhen: 1. Optimierung der Wachstums- und Anzuchtbedingungen, 2. Selektion von Hochleistungsstämmen.

Für die Durchführung einer umfassenden Optimierung und Selektion muß für die Quantifizierung der Alkaloide eine Bestimmungsmethode zur Verfügung stehen, die hoch spezifisch und empfindlich ist sowie einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Die für die Bestimmung von Ergotalkaloiden, Catharanthus- und Rauwolfia Alkaloiden benutzten chromatographischen und spektrometrischen Nachweismethoden sind alle sehr aufwendig (bei der GC und HPLC Bestimmung müssen die Extrakte beispielsweise vorgereinigt werden) und besitzen daher eine zu geringe Probenkapazität (s. Tab. 20). Darüber hinaus reicht die Empfindlichkeit einiger gebräuchlicher Analysemethoden (DC) für bestimmte Meßprobleme (Bestimmung von Substanzen in Gewebe- oder Myzelkulturen) nicht aus (s. Tab. 20).

Ein Nachweisverfahren, das alle gestellten Forderungen erfüllt, ist der Radioimmunoassay (RIA). Er ist nahezu allen bisher routinemäßig durchgeführten Bestimmungsmethoden bezüglich Nachweisempfindlichkeit, Spezifität, Arbeitsaufwand und Größe der Probenserien überlegen.

Beim Radioimmunoassay werden die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Verbindungen und die extrem hohe Spezifität der radioimmunologischen Reaktion miteinander verknüpft, so daß Substanzmengen im Nanogramm- und sogar Picoogramm-Bereich spezifisch erfaßt werden können. Dem Test liegt folgender Mechanismus zugrunde. Eine variable Anzahl unmarkierter Antigenmoleküle konkurriert mit einer konstanten Menge radioaktiv markierter Antigenmoleküle um eine konstante Zahl von Antikörperbindungsstellen. Dabei werden so viele Antikörper in einen Einzeltest eingesetzt, daß etwa 30% bis 50% der markierten Antigene in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden werden. Von den Antikörpern werden nun umso weniger markierte Moleküle gebunden, je mehr unmarkierte

zugesetzt werden, d.h. die Radioaktivität der Antigen-Antikörperkomplexe nimmt ab. Der Prozentsatz der gebundenen radioaktiv markierten Moleküle ist also ein Maß für die Menge an unmarkiertem Antigen im Testansatz. Um die Radioaktivität der gebundenen Antigen-Antikörperkomplexe zu ermitteln, müssen sie von den freien Antigenen getrennt werden. Viele RIA's unterscheiden sich durch das Verfahren und das Reagenz, das zu dieser Trennung benutzt wird.

Darüber hinaus sind eine Vielzahl von Immunoassays beschrieben worden, bei denen das Antigen nicht durch radioaktive Isotope, sondern durch Enzyme (Riesen et al., 1978), Thériault und Pagé, 1977, Kitagawa et al., 1978) oder Spin-markierte Moleküle (Leute et al., 1972) markiert ist. Ein weiteres Immunoassay System beruht darauf, den Antikörper radioaktiv zu markieren (Immunoradiometric assay, Miles et al., 1974). Die damit aufgebauten Tests haben den Radioimmunoassay jedoch auf Grund schlechterer Spezifität und Sensitivität nicht verdrängen können, daher wurden die Antigene für den Aufbau der in dieser Arbeit beschriebenen Immunoassays radioaktiv markiert.

Der erste Radioimmunoassay wurde 1959 von Berson und Yalow für die Bestimmung von Insulin aufgebaut. Neun Jahre später wurde von Oliver et al. (1968) der erste RIA für die Bestimmung einer niedermolekularen Substanz (Digitoxin) entwickelt, die an ein Carrier Protein gekoppelt werden mußte, um eine Antikörperbildung zu induzieren. Es sind bisher für mehrere hundert Substanzen aus fast allen Stoffklassen Radioimmunoassays aufgestellt worden (Tab. 1), was die generelle Anwendbarkeit des RIA's demonstriert.

STOFFKLASSE	SUBSTANZ	LITERATURANGABE
Peptid-Hormone	Glukagon	Young und Kraegen, 1968
Nicht-Peptid-Hormone	Deoxycortisol	Schöneshöfer und Harendt, 1977
Enzyme	Isoenzym MM	Van Steirteghem et al., 1978
Serumproteine	Serumalbumin	Bissell und Tilles, 1972
Vitamine	Vitamin A	Conrad und Wirtz, 1972
Tumor assoziierte Antigene	Alphafetoprotein Carcino-embryonales Ag	Schiller et al., 1978 Wagener u. Breuer, 1978
Insektizide	DDT	Centeno et al., 1970
Arzneimittel	Aprindin Gentamicin Nortriptylin	Lésne u. Dolphén, 1977 Ashby et al., 1978 Maguire et al., 1978

Tab. 1: Auswahl einiger Radioimmuntests für Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen.

Auch für sekundäre Pflanzenstoffe sind schon Radioimmunoassays aufgebaut worden (Tab. 2). Zuerst wurden diese Tests jedoch ausschließlich in der Medizin angewandt. Erst in der letzten Zeit ist der RIA für die Quantifizierung von Sekundärmetaboliten in der Pflanzenzüchtung (Weiler, 1977, Arens et al., 1978, Weiler und Westekemper, 1979), bei der Optimierung von Gewebekulturen (Zenk et al., 1977) sowie für die Bestimmung eines Pflanzenhormons in verschiedenen Pflanzenarten (Weiler, 1979) eingesetzt worden. Dabei zeigte sich, daß die RIA Technik für diese Untersuchungen optimal geeignet ist.

SUBSTANZ	ANWENDUNGSBEREICH	LITERATUR
Penicillin	Medizin	Wal et al., 1975
Amanitin	"	Faulstich et al., 1975
Nikotin	"	Haines et al., 1974
Morphin	"	Steiner u. Spratt, 1978
Reserpin ⁺	"	Levi et al., 1976
9,10-Dihydroergotamin ⁺	"	Rosenthaler u. Munzer, 1976
Vinblastin+Vincristin ⁺	"	Teale et al., 1977
Digoxin	Phytochemie	Weiler u. Zenk, 1977 Weiler u. Westekemper, 1979
Abscisinsäure	"	Weiler, 1979
Serpentin ⁺	"	diese Arbeit
Raubasin ⁺	"	"
Ajmalin ⁺	"	"
Ergotamin ⁺	"	"
Ergocristin ⁺	"	"
Ergometrin ⁺	"	"
Lysergsäure ⁺	"	"

⁺ Indolalkaloide

Tab. 2: Auswahl einiger Radioimmunoassays für die Quantifizierung von sekundären Pflanzenstoffen.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit lag darin, Radioimmuntests für Indolalkaloide aufzubauen und die Einsatzmöglichkeit dieser spezifischen und hochsensitiven Bestimmungsmethode an weiteren Beispielen auf dem Gebiet der Pflanzenzüchtung und

der Optimierung von Gewebekulturen sowie auf neuen Anwendungsgebieten zu demonstrieren.

Deshalb sollten Radioimmuntests für die Bestimmung der Indolalkaloide Ajmalin, Ergotamin, Ergocristin, Ergometrin und Lysergsäure erstellt werden. Weiterhin galt es zu testen, ob das für die Indolalkaloide Serpentin und Raubasin aufgestellte halbautomatisierte Testsystem (Arens, 1976) auch für die Bestimmung dieser Alkaloide angewendet werden kann.

Mit der radioimmunologischen Selektion von Catharanthus roseus Hochleistungspflanzen und der radioimmunologischen Optimierung von Rauwolfia vomitoria Gewebekulturen sollten weitere Beispiele für die generelle Anwendbarkeit des Radioimmunoassays bei der Pflanzenzüchtung bzw. bei der Optimierung von pflanzlichen Gewebekulturen gezeigt werden.

Weiterhin sollte erstmals die Einsatzmöglichkeit des Radioimmuntests für die Bestimmung von Pilzinhaltsstoffen (Ergotamin, Ergocristin, Ergometrin) bei der Selektion von parasitischen und saprophytischen C. purpurea Hochleistungsstämmen und bei der Optimierung einer saprophytischen C. purpurea Kultur demonstriert werden.

II. Material und Methoden

1. Pilz- und Pflanzenmaterial

1.1 Herkunft und Anzucht von Catharanthus roseus G. Don Pflanzen

Die C. roseus Samen waren weltweit von Privatpersonen gesammelt oder von botanischen Gärten freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Die Samen wurden zur Keimung in Petrischälchen auf feuchtes Filterpapier aufgelegt. Nach ca. 1 Woche wurden die Sämlinge in Multitopfplatten (Fa. Nebelung), die aus 38 Einzeltöpfen ($r=2,75$ cm) bestehen, pikiert. Zur Anzucht aller C. roseus Pflanzen wurde das gleiche Erdgemisch benutzt. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer bei einer Tagestemperatur von $27,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, einer Nachttemperatur von $24,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $80\% \pm 1\%$ angezogen. Sie wurden mit Leuchtstoffröhren (Osram, 140 W) täglich 16 Stunden belichtet. Die Lichtstärke betrug in Pflanzenhöhe ca. 10000 Lux.



Abb. 2: Anzucht von C. roseus Pflanzen in einer Klimakammer.

1.2 Herkunft und Anzucht von Rauwolfia Pflanzen und Anlage von R. vomitoria (Afz.) Gewebekulturen

Die R. vomitoria Samen wurden freundlicherweise von Dr. Fer-vidi, Mailand, zur Verfügung gestellt. Die anderen Rauwolfia Arten stammten von verschiedenen botanischen Gärten. Alle benutzten Rauwolfia Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 25°C angezogen.

Die Gewebekulturen wurden zu einem großen Teil von Frau El-Shagi aus dem Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bochum angelegt. Blätter von zwei und drei Monate alten R. vomitoria Pflanzen wurden in 5% Natriumhypochloridlösung 20 min. lang sterilisiert, anschließend mit sterilem H₂O gewaschen und auf die Agarmedien 4x (Gamborg et al., 1968) und DAX Medium aufgelegt. Die Petrischalen mit den Explantaten wurden zur Kallusbildung im Dunkeln bei 30°C aufbewahrt. Nach 2 - 3 Wochen bildete sich Kallus, der zur Anlage von Zellsuspensionskulturen in Flüssigmedien (4x) überführt wurde. Daraus ließ sich unter wiederholten Passagen im Abstand von 14 Tagen in frisches Medium im Laufe von ca. 3 Monaten eine gutwachsende Suspensionskultur etablieren. Zur Gewinnung von Inoculum für die Animpfung von Produktionskulturen wurden Vorkulturen in 1 l Erlenmeyerkolben mit 300 ml Medium 4x angelegt. Das Inoculum bestand aus 2 cm³ Gewebe. Mit diesem Inoculum wurden 50 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Produktionsmedium (s. Tab. 8) angeimpft. Alle Flüssigkulturen wurden bei 30°C auf einem Rotationsschüttler mit 100 upm im Dunkeln angezogen. Alle Medien wurden bei 120°C 20 min. lang autoklaviert.

1.3 Herkunft von Claviceps purpurea (Fries) Tulasne Sklerotien

Das für die Selektionsuntersuchungen benutzte Sklerotienmaterial bestand aus 36 verschiedenen Herkunftten. Abb. 3a gibt einen Überblick über die morphologische Vielfaltigkeit der Sklerotien. Sie waren von Privatpersonen gesammelt oder von Arzneimittelfirmen bezogen worden. Die meisten Herkunftte stammten aus Deutschland, einige aber auch aus Indien, Finnland, Frankreich und Irland. In keinem Fall lagen Angaben über den Alkaloidgehalt der Sklerotien vor.



Abb. 3a: Repräsentative Sklerotien aus den 36 verschiedenen Herkunftten. 1-24: Wirtspflanze: Roggen, 25-36: Wirtspflanze: verschiedene Gräser. Herkunft 1: U.K.I, Herkunft 2: Indien II, Herkunft 24: Sklerotien vom Stamm 202.

1.4 Anzucht von Roggen im Freiland und in der Phytokammer

Für die Anzucht der Sklerotien wurde bei allen Versuchen Winterroggen der Rasse Kustro benutzt. Jeweils 20 Roggenpflanzen wurden in einen 50 l Plastikkübel, der normale Einheitserde enthielt, pikiert. Die Pflanzen eines Kübels wurden immer nur mit den Sporen eines Stammes infiziert, so daß Verwechslungen nicht möglich waren. Darüber hinaus konnten die Plastikkübel bei den Freilandinfektionen im Versuchsgelände verteilt und so Fremdinfectionen vermieden werden. Der für die Freilandversuche benutzte Roggen wurde Ende Oktober im Versuchsgelände des botanischen Gartens der Ruhr-Universität Bochum ausgesät und dann Anfang Mai in die Kübel pikiert.

Die Anzucht von Roggen in der Klimakammer (s. Abb.3b) wurde durch eine persönliche Mitteilung von F. Hoffmann, Ladenburg, für die an dieser Stelle gedankt sei, ermöglicht. Sie wurde leicht modifiziert, indem die Temperatur während der Blühphase des Roggens erniedrigt wurde, um den Blühprozeß zu verlangsamen, was sich positiv auf die Sklerotienbildung auswirkt. Tab. 3 zeigt die Bedingungen, unter denen der Roggen in der Phytokammer angezogen wurde.

Zeit	Luftfeuchtigkeit (%)	Temperatur (°C)			Lichtintensität in Höhe d. Pflanzen (L)
		Tag	Nacht	Stunden	
1 Woche	60 - 80	18	16	8	2000
7 Wochen	"	4	4	8	2000
3 Wochen	"	15	12	14	10 000
3 Wochen	"	22	18	16	10 000
3 Wochen	"	22	18	12	10 000

Tab. 3: Anzuchtschema für Roggenpflanzen in der Klimakammer

Die Roggenpflanzen wurden nach der Vernalisationszeit in die Plastikkübel pikiert. Nach erfolgter Infektion mit C. purpurea wurden die Pflanzen sowohl im Freiland als auch in der Klimakammer von Mehltau befallen, was aber die Sklerotienausbildung nicht entscheidend beeinflusste.

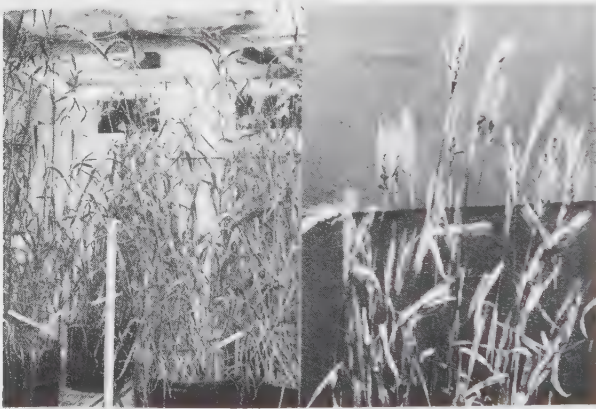


Abb. 3b: Anzucht von Sklerotien auf Roggen in der Klimakammer.

1.5 Anlage von parasitischen Mutterkornkulturen

Für die Infektion der Roggenpflanzen wurden Sporen aus saprophytischen Festkulturen benutzt. Es wurde aus dem Zentrum der Kultur ein kreisrundes Myzelstück ($r=0,5$ cm) ausgestanzt und in ein mit 2 ml H_2O gefülltes Szintillationsgläschen gegeben. Die Lösung wurde ca. 60 s am Whirlymix geschüttelt, um die Sporen vom Myzel abzuschwemmen. Anschließend wurde die Anzahl der Sporen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Sporensuspension wurde so verdünnt, daß ca. 5000 Sporen in einem μ l vorhanden waren. Mit dieser Lösung wurde die Infektion der Roggenpflanzen nach einer Methode von Békésy (1938) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Roggenblüten wenigstens 5 Tage vor dem Aufblühen infiziert, da in diesem Fall die Infektion immer erfolgreich ist. Das erklärt sich dadurch, daß die unreifen Staubbeutel für den Pilz als Nährboden dienen. Die Infektion von blühenden Roggenähren wird durch die kurze Blühzeit und das unterschiedliche Aufblühen stark behindert und ist meist wenig erfolgreich.

In eine geschlossene Roggenblüte wurde mit einer 2 ml Plastikspritze mit einer Kanüle Nr. 18 ein Tropfen der Infektionslösung (ca. 20 000 Sporen) injiziert. Dabei spielte es keine Rolle, an welcher Stelle der Blüte der Einstich vorgenommen wurde. Bei hohen Infektionszahlen pro Ähre (>5) wurden zwar alle Blüten erfolgreich infiziert, d.h. es bildete sich am Fruchtknoten Myzel aus, es entwickelten sich aber nicht in allen Fällen Sklerotien.

1.6 Anlage von saprophytischen Mutterkornkulturen

Saprophytische Mutterkornkulturen wurden aus Sklerotien angelegt. Dazu wurde ein 0,2 mm - 0,5 mm langes Sklerotiumstück in 5%iger HgCl_2 -Lösung 5 min. unter Rühren sterilisiert. Eine Ausnahme bildeten dabei die degenerierten Sklerotien des Stammes 202, die nur 1 min. in einer 1%igen HgCl_2 -Lösung sterilisiert wurden, da sie bei längeren Sterilisationszeiten oder höheren HgCl_2 -Konzentrationen zerstört wurden. Die keimfreien Sklerotienstücke wurden dann auf das Agarmedium A unter sterilen Bedingungen aufgelegt. Das Medium A wurde aus einem von Amici et al. (1966) beschriebenen Medium durch eine leichte Abwandlung entwickelt. Aus den Sklerotienstücken entwickelte sich nach 10 - 30 Tagen Myzel, das für die Anlage von parasitischen und saprophytischen Kulturen benutzt werden konnte. Diese und die im folgenden erwähnten Festkulturen wurden bei Zimmertemperatur ($23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) angezogen. Zur Herstellung des Mediums A wurden 100 g Saccharose, 10 g Asparagin, 0,25 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,1 g Hefeextrakt und 18 g Agar in 1 l Leitungswasser gelöst. Der pH wurde mit einer 5%igen NH_4OH Lösung auf 5.2 eingestellt.

Für die Anlage von Vorkulturen wurde aus jungem, nicht differenziertem Myzel (s. Kapitel 6.4.1) eine kreisrunde Probe ($r=0,5$ cm) aus dem Agar ausgestanzt und in ein mit drei ml Vorkulturmedium und 10 Glaskugeln ($r=0,25$ cm) gefülltes dickwandiges Reagenzglas mit 20 ml Fassungsvermögen gegeben. Das Reagenzglas wurde dann 30 sec. am Whirlymix geschüttelt, so daß die Myzelprobe durch die Glaskugeln zerschlagen wurde. Anschließend wurde die Myzelsuspension in einen mit 47 ml Vorkulturmedium gefüllten 300 ml Rundkolben gegeben. Die Rundkolben wurden, wenn nicht anders erwähnt, auf einem Rotationsschüttler, den die Werkstatt der Abteilung Biologie konstruiert hatte, bei 25°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 upm im Dunkeln 5 - 6 Tage angezogen. Auf diese Weise gelang es, homogene Vorkulturen zu erzeugen, die im Hinblick auf die Produktionskulturen reproduzierbare Ergebnisse er-

möglichten.

Es wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Medien für die Anlage der Vorkulturen benutzt (Amici et al., 1967, Arcamone et al., 1970). Der Stamm 202 wurde jedoch ausschließlich im Vorkulturmedium VS II angezogen, das nach Amici et al. (1966) modifiziert worden war. Es enthielt in einem Liter Leitungswasser 10 g Asparagin, 20 g Saccharose, 0,1 g Hefeextrakt, 0,25 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g KH_2PO_4 , 0,12 g KCl, 1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,015 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und wurde mit einer 5%igen NH_4OH -Lösung auf einen pH von 5.2 eingestellt.

Die Produktionskulturen, die zu einer Versuchsreihe gehörten, wurden mit dem Inoculum aus einer Vorkultur angeimpft, falls nötig, wurden mehrere Vorkulturen gepoolt. Die Produktionskulturen, die 45 - 48 ml Produktionsmedium enthielten, wurden mit 2 ml - 5 ml Inoculum angeimpft. Die Anzucht erfolgte im 300 ml Rund- und im 300 ml Schikanekolben, der aus einem Rundkolben durch das Einbrennen einer 3,5 cm langen und 0,5 cm tiefen bis zum Boden reichenden senkrechten Kerbe hergestellt worden war. Die benutzten Produktionsmedien sind in Tab. 18 aufgeführt. Das Medium S II, in dem der Stamm 202 hauptsächlich angezogen wurde, enthielt die wichtigsten Komponenten der in der Tabelle 18 angegebenen Medien in durchschnittlichen Konzentrationen. In einem Liter destilliertem H_2O wurden 80 g Saccharose, 0,5 g Asparagin, 4 g Bernsteinsäure, 0,25 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g KCl und 0,015 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ gelöst und mit 5%iger NH_4OH -Lösung auf einen pH von 5.2 eingestellt. Die Produktionskulturen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkulturen angezogen und nach 6 - 10 Tagen Kultivierungszeit geerntet.

Für die Anlage der Myzelisolate wurde ebenfalls aus undifferenziertem Myzel eine kreisrunde Probe ($r=0,5$ cm) ausgestantzt, die in der beschriebenen Weise zerschlagen wurde. Die Myzelsuspension wurde durch ein Nylonnetz mit der Porengröße 20 μm (Fa. Monodur) gefiltert, um nach Möglichkeit Einzelzellen zu

isolieren. Die C. purpurea Zellen des Stammes 202 hatten etwa eine Länge von $10 \mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$. Die Lösung wurde dann 1:10 und 1:100 verdünnt und je 0,1 ml der Lösungen wurde in Petrischalen mit dem Medium A S II, das die gleiche Zusammensetzung hatte wie das Produktionsmedium S II, mit einem Glasrechen verteilt. Sobald Hyphen auf den Platten zu erkennen waren (in der Regel nach 4 - 5 Tagen) wurden sie einzeln mit einer Impfnadel in Petrischalen mit dem Medium A S II überimpft. Für die Isolierung der Myzelisolate wurden Petrischalen mit möglichst wenigen Myzelkolonien (ca. 10 ± 5) benutzt. Dadurch sollte die Überimpfung von verschiedenen zusammengewachsenen Myzelisclaten verhindert werden. Abb. 4 zeigt zwei Kulturen von Myzelisolaten des Stammes 202.

Für die Anlage der Einsporenkulturen wurde aus differenziertem Myzel (ca. 30 - 50 Tage alt) eine kreisrunde Probe ($r=0,5 \text{ cm}$) ausgestantzt, die in ein Reagenzglaschen mit 5 ml H_2O gegeben wurde. Die Probe wurde am Whirlymix ca. 30 sec. geschüttelt.

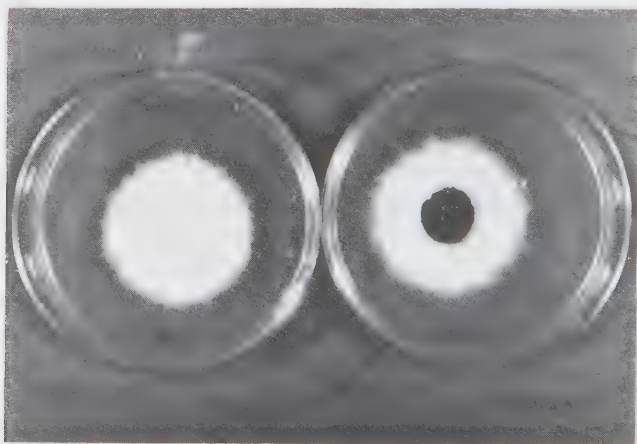


Abb. 4: Myzelisolate des C. purpurea Stammes 202.

Beim rechten Myzelisolat ist für die Alkaloidbestimmung eine Probe entnommen worden.

Anschließend wurde die Anzahl der Sporen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Sporensuspension 1:10, 1:100 und gegebenenfalls 1:1000 verdünnt und je 0,1 ml der Lösungen in Petrischalen mit dem Medium A mit einem Glasrechen verteilt. Sobald die Sporen ausgekeimt waren (4 - 5 Tage), wurden sie wieder mit Hilfe einer Impfnadel in andere Petrischalen mit Medium A vereinzelt. Für die Isolierung der Einsporenkulturen wurden Petrischalen mit wenigen Einsporenkulturen benutzt. Dadurch sollte auch hier die Überimpfung von zusammengewachsenen Kulturen vermieden werden. Das Myzel dieser Einsporenkulturen bildete dann wieder Sporen, die in der beschriebenen Weise (s. Kapitel 1.5) für die Anlage von parasitischen Mutterkornkulturen benutzt wurden.

2. Versuchstiere

Für die Gewinnung der Antiseren wurden Kaninchen benutzt. Die Antikörperbildung ist in hohem Maße vom Genotyp des Tieres abhängig (s. Kapitel 2.3). Deshalb mußte bei der Auswahl der Tiere darauf geachtet werden, daß nicht alle Tiere der gleichen Zuchtrasse angehörten. Bei reinrassigen Tieren (Inzucht!) besteht die Gefahr, daß alle Kaninchen keine geeigneten Antiseren für die Erstellung eines RIA's produzieren.

Die Tiere wurden im vollklimatisierten Raum in Metallkäfigen gehalten und erhielten nur Trockenfutter, wodurch das Einschleppen von Krankheiten vermieden werden sollte. Nicht zu verhindern war dagegen der periodische Befall der Tiere mit Ohrenräude, die durch den Befall des Ohres mit parasitierenden Milben (*Psoroptes communis*) hervorgerufen wird. Eine Ausdehnung der Krankheit auf das Mittelohr führte in einigen Fällen zum Tod der Tiere.

3. Reagentien

Rinderserum wurde von der Firma Mediapharm, Aschaffenburg, bezogen. Freund's komplettes Adjuvant stammte von Difco, Detroit. Als Szintillator wurde Unisolve - 1 (Koch - Light), geliefert von Zinsser, Frankfurt, verwendet. Die anderen benutzten Chemikalien und Lösungsmittel waren von höchstmöglicher Reinheit.

Das zur Herstellung des Immunogens und des ^3H Tracers sowie zur Standardisierung des Tests benutzte Ajmalin wurde ebenso wie die zur Bestimmung von Kreuzreaktionen verwandten Substanzen von Inverni della Beffa, Mailand, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das für die Herstellung der RIA's benutzte Ergotamin-D-tartrat stammte von der Fluka A.G., Buchs (Nr. 45510), Ergocristin von Roth, Karlsruhe, (Nr. 9928) und Ergometrin ebenfalls von Roth (Nr. 9930).

Die zur Bestimmung der Kreuzreaktionen verwandten Ergotal-kaloide wurden freundlicherweise von der Sandoz A.G., Basel, zur Verfügung gestellt.

Die zur Standardisierung der Tests und zur Bestimmung der Kreuzreaktionen benutzten Substanzen wurden alle in Methanol gelöst (1 mg/5 ml Methanol) und dann in H_2O verdünnt.

Als Puffer für alle Radioimmuntests wurde phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (0.01 M Phosphat, 0.15 M NaCl, pH 7.4) verwandt. Sie wurde durch Lösungen von 1,824 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und 0,276 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sowie 8,77 g NaCl in 1000 ml H_2O hergestellt.

Die gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 800 g Ammoniumsulfat wurden in 1000 ml H_2O gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt und ungelöstes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde am nächsten Tag abfiltriert. Die gesättigte Lösung wurde dann für den jeweiligen Test entsprechend verdünnt.

4. Radiochemikalien

Das für die Markierung von Tyramin-Lysergsäure benutzte 125-Jod wurde als Na^{125}J in NaOH von NEN bezogen (NEZ - 033H, trägerfrei, Sp. A. 2100 Ci/mmol). ^{14}C Tyraminhydrochlorid wurde ebenfalls von NEN bezogen (Sp. A. 50 mCi/mmol). Die für den Aufbau der Radioimmuntests benutzten Tracer ^3H Ajmalin, ^3H Ergocristin und ^3H Ergotamin wurden von Amersham-Buchler bezogen. Bevor sie für den Aufbau der RIA's Verwendung finden konnten, mußten sie von unerwünschten Begleitstoffen gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte dünnschichtchromatographisch. Aliquots der äthanolischen Lösungen mit einer Radioaktivität von ca. 2 mCi wurden mit Vergleichssubstanzen auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und im Laufmittel n-Butanol:Eisessig: $\text{H}_2\text{O}=80:20:20$ (^3H Ajmalin bzw. im Laufmittel Chloroform:Äthanol=92:8 (^3H Ergotamin und ^3H Ergocristin) entwickelt. Die ^3H Ajmalin- bzw. ^3H Ergotamin- und ^3H Ergocristinbande wurden ausgeschnitten, und die Substanzen mit Methanol eluiert. Zur Überprüfung der Reinheit wurden aliquote Teile der Eluate in mindestens drei verschiedenen Laufmitteln entwickelt und die Radioaktivitätsverteilungen auf den D.C. Platten mit einem Dünnschichtscanner mit geschlossenem Schreiber (Fa. Berthold) bestimmt. Es zeigte sich in allen Fällen nur ein ausgeprägter Radioaktivitätspeak, der mit der Vergleichssubstanz absolut übereinstimmte, womit die Reinheit der Tracer bewiesen war.

Die spezifischen Aktivitäten der Tracer wurden nach der Self-Displacement Methode bestimmt.

Die Methode beruht darauf, daß steigende markierte Antigenmengen mit einer konstanten Antikörpermenge bei normalen Testbedingungen inkubiert werden. Die B/F Rate (Quotient aus gebundenem und freiem Antigen) bei steigenden markierten Antigenmengen wird dann mit der B/F Rate bei steigenden unmarkierten Antigenmengen (normale Standardkurve) verglichen (s. Abb. 5a). Um die bei der Erstellung einer Standardkurve benutzten markierten Antigenmengen zu berücksichtigen, entwickelte Morris (1976) folgende Auftragung.

Die unmarkierte Antigenmenge, die zu der gleichen B/F Rate führt wie die markierte, wird gegen die entsprechenden cpm Werte der markierten Antigene auf der Abszisse aufgetragen (s. Abb. 5b). Der Kehrwert der Steigung der entstandenen Geraden gibt die spezifische Aktivität des Tracers an.

Die so ermittelte spezifische Aktivität des 3H Ajmalins betrug 7,5 Ci/mmol, die des 3H Ergotamin 21,1 Ci/mmol und die des 3H Ergocristin 7,2 Ci/mmol.

Die in den Kapiteln 2.4, 4.4 und 5.5 dargestellten Standardkurven zeigen die hohe Empfindlichkeit der Radioimmuntests, die unter Verwendung dieser Tracer mit den beschriebenen spezifischen Aktivitäten erreicht wurde.

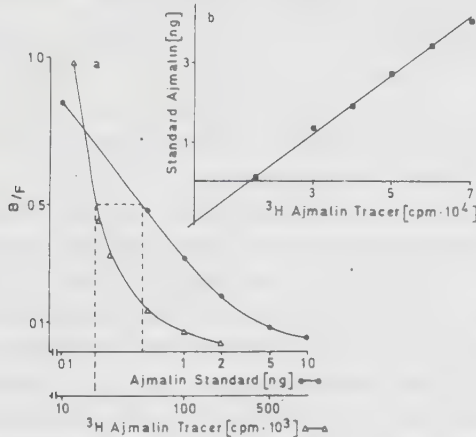


Abb. 5a - b: Ermittlung der spezifischen Aktivität von 3H Ajmalin

- Auftragung der B/F Rate gegen die Menge an Ajmalinstandard und gegen die Radioaktivität von eingesetztem 3H Ajmalin. Die gestrichelten Linien zeigen, wie die markierten und unmarkierten Antigenmengen mit gleicher B/F Rate ermittelt werden können.
- Auftragung der unmarkierten Ajmalinmenge (ng) gegen die Tracermenge (cpm) mit gleicher B/F Rate. Der Kehrwert der Steigung der Geraden gibt die spezifische Aktivität des Tracers an. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse gibt die Radioaktivität des Tracers an, der in jede der zur Ermittlung der Standardkurve benötigten Proben eingesetzt wurde.

5. Dünnschichtchromatographische Bestimmungen von Ajmalin und Ergotalkaloiden

Ajmalin und Ergotalkaloide enthaltende Extrakte wurden zusammen mit in Methanol gelösten Standards auf Kieselgeldünnschichtplatten aufgetragen und im Laufmittel Aceton:Petroläther ($40^{\circ} - 60^{\circ}$): Diäthylamin = 20:70:10 bzw. im Laufmittel Essigsäureäthylester:Dimethylformamid:Äthanol (96%) : NH_3 (25 %) = 130:19:1:0.2 entwickelt. Die quantitative Auswertung erfolgte bei der Wellenlänge maximaler Absorption bzw. Fluoreszenz mit Hilfe des Zeiss Spektralphotometers KM3.

Zu diesem Zweck wurde eine entwickelte Chromatogrammbahn unter der spaltförmigen Meßfläche des Gerätes vom Startpunkt bis zur Laufmittelfront vorbeigeführt. Der Spalt wurde dabei so breit gewählt, daß der größte der Chromatogrammflecke noch voll erfaßt wurde.

Für die Auswertung wurden die Gipfel der Ortskurven benutzt, da ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakhöhe und der Substanzmenge besteht. Die Auswertung erfolgte über Eichgeraden. Deshalb wurden auf jeder DC Platte fünf Proben mit unterschiedlichen, aber bekannten Substanzmengen zusätzlich aufgetragen.

Ajmalin wurde mit der Remissionsmessung in der Geräteeinstellung M-Pr bestimmt. Da die Absorptionen sehr klein waren, wurde am Schreiber durch Wahl eines empfindlicheren Meßbereichs eine Spreizung des Meßsignals vorgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 254 nm, die Spaltbreite 0,8 mm, der Vorschub des Schreibers 600 mm/min. Die Eichgerade war linear von 0,5 μg - 5 μg Ajmalin.

Die Ergotalkaloide wurden mit der Fluoreszenzmessung in der Geräteeinstellung Pr-M bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 313 nm, die Spaltbreite 0,6 mm, der Vorschub des Schreibers 600 mm/min. Die Eichgeraden waren linear von 0,2 μg - 1 μg (Ergotamin und Ergocristin) bzw. 0,3 μg - 1,5 μg (Ergometrin).

6. Erzeugung von Antikörpern

Die Erzeugung eines geeigneten Antiserums ist der wichtigste Schritt bei der Herstellung eines RIA's. In der Literatur sind eine Fülle von Immunisierungstechniken beschrieben worden (Lader et al., 1974). Die meisten Immunisierungen werden intradermal, subcutan oder intravenös an verschiedenen Stellen des Tierkörpers ausgeführt. Die Tiere werden fast immer vorimmunisiert und anschließend in regelmäßigen Abständen geboostert. Weiterhin unterscheiden sich die Methoden in der Immunogenmenge, die den Tieren eingespritzt wird und in der Tierart, die benutzt wird. Es ist bis heute keine Immunisierungsprozedur bekannt, die von vornherein erfolgversprechender ist als alle anderen.

Alle in dieser Arbeit erwähnten Antiseren sind in Kaninchen erzeugt worden. Kaninchen eignen sich von den zur Antikörpergewinnung benutzten Tierarten besonders gut, weil sie bei Immunisierungen und Blutentnahmen ruhig sind, leicht gehalten werden können und keine großen Ansprüche an das Futter stellen.

Die Kaninchen wurden alle nach der gleichen Immunisierungstechnik behandelt. Sie wurden zuerst viermal im Abstand von einer Woche mit 0,5 ml Konjugatlösung intradermal in die Rückenhaut vorimmunisiert und dann alle vier Wochen mit 1 ml des Konjugatgemisches in die Muskulatur des rechten oder linken Hinterlaufs geboostert.

Bei der Herstellung der Konjugatlösung wurde das Konjugat in phosphatphysiologischem Phosphatpuffer pH 7.4 in einer Konzentration von 2 mg Protein/ml Puffer gelöst und mit dem gleichen Volumen Freudschem Adjuvant versetzt. Die Lösung wurde durch Ultraschall (am Branson S 125 Sonifier) gemischt.

Das Freudsche Adjuvant besteht aus Paraffinöl, abgetöteten Mycobakterien und einem Detergenz, das die Ausbildung der Öl-Wasser Emulsion ermöglicht. Das Adjuvant ist für eine erfolgreiche Antikörpergewinnung unbedingt notwendig (Landon, 1976).

Die Wirkungsweise ist vielseitig. Es ermöglicht eine langsame Abgabe des Immunogens in die Blutbahn, erleichtert die Phagocytose durch Makrophagen und vermehrt die Anzahl der Makrophagen und Lymphozyten durch eine Aktivierung des reticulo-endothelialen Systems.

20 ml - 40 ml Blut wurde den Tieren 7 und 14 Tage nach jeder Boosterinjektion aus der Ohrvene des rechten oder linken Ohres entnommen. Das in Plastikzentrifugenbechern aufgefangene Blut wurde mindestens 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde es mit Hilfe einer Pasteurpipette von der Becherwand losgelöst und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, wo sich das Blutserum vom Blutkuchen absonderte. Das Antiserum wurde dann noch zentrifugiert, um Reste vom Blutkuchen zu beseitigen und anschließend bei -20°C im Gefrierraum aufbewahrt. Es konnte für den RIA ohne weitere Reinigung eingesetzt werden.

7. Durchführung und Automatisierung der RIA's

Alle Radioimmunoassays mit ^3H Tracer wurden nach dem von Arens (1976) ausgearbeitetem System durchgeführt. Es hat den großen Vorteil, daß die Radioaktivität einer Probe in nur 1 ml Szintillator gezählt werden kann. Ermöglicht wird das durch folgenden Trick: Der Szintillator wird direkt in das Reaktionsglas pipettiert, welches durch die Aussparung des Deckels eines Szintillationsglases geschoben wird, so daß eine Radioaktivitätsbestimmung im β -Zähler möglich ist.

Der Ablauf des ^{125}J RIA's konnte ähnlich wie der mit ^3H Tracer gestaltet werden (s. Tab. 4). Testvereinfachend und kostensparend wirkte sich aus, daß die Radioaktivität des in H_2O gelösten Pellets direkt im Gammazähler bestimmt werden konnte.

In jede Probe wurde eine Gesamtradioaktivität von ca. 10.000 cpm eingesetzt. Das Antiserum wurde so verdünnt, daß ca. 30% - 40% des eingesetzten Tracers gebunden wurden. Die Verdünnungsstufe wurde ermittelt, indem steigende Antiserumverdünnungen mit einer konstanten Menge Tracer (ca. 10.000 cpm) inkubiert wurden. Die optimale Rinderserumkonzentration, der günstigste pH Wert des Puffers und die geeignetsten Inkubationszeiten und -temperaturen wurden für jeden Test individuell bestimmt (s. Kapitel 2.2, 4.2 und 5.3).

Die pro Probe eingesetzte Gesamtradioaktivität wurde ermittelt, indem an Stelle der Standard- oder Probenlösung (unmarkiertes Antigen) Pufferlösung einpipettiert wurde (Proben-typ A). Probentyp B enthielt weder Antiserum noch unmarkiertes Antigen und diente zur Feststellung der unspezifischen Bindung des Tracers. Von allen Proben- und Standardwerten wurde die unspezifische Bindung abgezogen.

Alle Tests wurden mit Hilfe des Analmatic-Systems sowie einem β - oder γ -Zähler und einem programmierbaren Kleinrechner halbautomatisiert (Weiler, 1977).

	^3H Tracer			^{125}J Tracer		
Probentypen	A	B	C	A	B	C
Puffer (ml)	0.6	0.7	0.5	0.6	0.7	0.5
Rinderserum (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Tracer (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Standard oder Probe (ml)	--	--	0.1	--	--	0.1
Antiserum (ml)	0.1	--	0.1	0.1	--	0.1
Inkubationszeit (Zimmertemperatur)						
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ml)	1	1	1	1	1	1
Inkubationszeit Zentrifugation						
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ml)	1	1	1	1	1	1
(Spülschritt)						
Zentrifugation						
H_2O (ml)	0.15	0.15	0.15	0.5	0.5	0.5
Szintillator (ml)	1	1	1	--	--	--
 Szintillations- gläserchen B - Zähler  γ - Zähler						

Tab. 4: Ablaufschema der Radioimmunoassays mit ^3H und ^{125}J Tracer. Probetyp A und B dienen zur Ermittlung der insgesamt eingesetzten Radioaktivitätsmenge bzw. der unspezifischen Bindung. Probentyp C sind Standard- oder Probenwerte.

Je 100 Extrakte von Pflanzen, Myzelien, Gewebekulturen usw. konnten mit dem Analmatic System gleichzeitig verdünnt werden. Der Pipettierfehler hierbei betrug weniger als 1,5%. Auch alle weiteren Pipettierschritte, einschließlich der Szintillatorzugabe, konnten mit der Analmatic Pipettiermaschine durchgeführt werden. Es erwies sich jedoch für die Richtigkeit der Bestimmungen als günstiger, die 0.1 ml Volumina (Probe oder Standard und Antiserum) mit einer Eppendorf Pipette zuzugeben. Die Proben konnten ebenfalls in 100er Einheiten mit der Analmatic Zentrifuge zentrifugiert werden. Das Einräumen der Reaktionsgläschen in die Szintillationsgläschen und dann in den β -Zähler bzw. γ -Zähler mußte manuell ausgeführt werden. Die Zählergebnisse wurden mit Hilfe einer an den Zähler angeschlossenen Teletype auf einem Lochstreifen gespeichert und anschließend mit Hilfe eines Kleincomputers (Hewlett Packard) ausgewertet. Mit Hilfe dieser Automatisierung konnten von einer Arbeitskraft pro Tag 200 - 300 Proben analysiert werden.

8. Berechnung radioimmunologischer Ergebnisse

Die mit dem RIA erzielten Endresultate lagen als cpm Werte vor. Von Doppel- und Dreifachbestimmungen wurden die Mittelwerte gebildet. Von allen Werten wurde die unspezifische Bindung (U.B. Wert) abgezogen.

Zur Erstellung der Standardkurve und zur Quantifizierung der unbekannten Probengehalte wurden die cpm Werte in die relative prozentuale Bindung B/B_0 (%) umgerechnet. Sie wird auf die Bindung von markiertem Antigen in Abwesenheit von unmarkierten Antigen (B_0) bezogen. Diese Umrechnung wird bevorzugt angewandt, weil sich geringe Differenzen in der Antiserum- oder Tracerverdünnung kaum auf den B/B_0 (%) Wert auswirken, was große Vorteile bei vergleichenden Untersuchungen mit sich bringt.

Bezeichnet man die gebundene Antigenmenge, die in linearem Zusammenhang mit den cpm Werten steht, mit B_0 bei Abwesenheit von unmarkiertem Antigen und mit B_x bei Anwesenheit von unmarkiertem Antigen, so kann der B/B_0 (%) Wert folgendermaßen berechnet werden.

$$B/B_0 (\%) = 100 \left(\frac{B_x - U.B.}{B_0 - U.B.} \right)$$

Die für die Auftragung von Standardkurven häufig benutzte logit Transformation (Rodbard, 1974) erlaubt eine linearisierte Auftragung der Standardkurvendaten (bei logarithmischer Auftragung der unmarkierten Antigenmengen).

Diese Berechnung erfolgt folgendermaßen:

$$\text{logit}(B/B_0 (\%)) = \ln \left(\frac{B/B_0 (\%)}{100 - B/B_0 (\%)} \right)$$

III. Ergebnisse

=====

1. Anwendung der Radioimmunoassays für Serpentin und Raubasin (Ajmalicin)

Die Aufstellung der Serpentin- und Raubasin RIA's ist in früheren Arbeiten schon beschrieben worden (Arens, 1976, Arens et al., 1978).

Dabei konnte die hohe Sensitivität und Spezifität dieser analytischen Methode veranschaulicht und die Richtigkeit der Bestimmungen bewiesen werden.

Die Radioimmuntests sind schon für die quantitative Bestimmung der Alkaloide benutzt worden. Es wurden Selektionsuntersuchungen an C. roseus Gewebekulturen durchgeführt (Zenk et al., 1977) und die Raubasinbildung mit einem pflanzlichen Enzymsystem verfolgt (Treimer und Zenk, 1978).

Im folgenden wird die Selektionszüchtung auf alkaloidreiche C. roseus Pflanzen mit Hilfe der beiden RIA's beschrieben, die für Selektionsuntersuchungen auf Grund ihrer hohen Probenkapazität von allen Analysemethoden am besten geeignet sind.

1.1 Selektion von C. roseus Pflanzen mit hohem Alkaloidgehalt

Als Ausgangsmaterial für das Screening Programm wurden C. roseus Pflanzen aus 19 verschiedenen Herkünften benutzt (s. Material), die zur Ermöglichung gleicher Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer unter konstanten Bedingungen angezogen wurden. Bevor mit der Analyse der Pflanzen begonnen werden konnte, mußte eine geeignete Probenentnahmestelle gefunden und der zeitliche Verlauf der Alkaloidbildung verfolgt werden. Dadurch sollten die Voraussetzungen für repräsentative und reproduzierbare Analysenergebnisse geschaffen werden. Alle Pflanzenproben wurden 15 Stunden lang in 5 ml Methanol bei 58°C im Wasserbad extrahiert.

1.1.1 Verteilung von Serpentin und Raubasin in einer 6 Monate alten C. roseus Pflanze

Eine ca. 6 Monate alte C. roseus Pflanze wurde in 0,5 cm - 4 cm lange Stengel- und Wurzelabschnitte zerlegt, um die Alkaloidverteilung zu untersuchen. Diese Pflanzenteile wurden ebenso wie Blätter und Blüten in Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden verdünnt und der Gehalt an Serpentin und Ajmalicin mit den beiden Bestimmungsmethoden bestimmt.

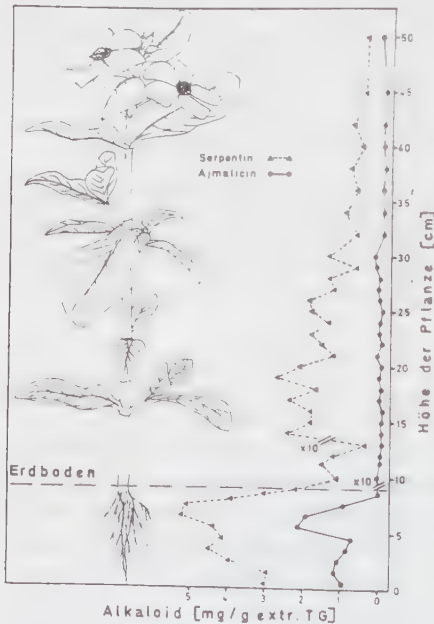


Abb. 6: Verteilung von Serpentin und Raubasin in einer differenzierten Catharanthus roseus Pflanze

Abb. 6 zeigt die Verteilung der beiden Alkaloide in der Pflanze. Es ist zu sehen, daß Serpentin und Raubasin hauptsächlich in der Wurzel vorkommen, wobei die höchsten Konzentrationen an beiden Alkaloiden im Wurzelhalsbereich festzustellen sind. Die grünen Pflanzenteile besitzen kein Raubasin, während Serpentin in geringen Konzentrationen im Stengel nachgewiesen werden kann.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die beiden Alkaloide fast ausschließlich in der Wurzelrinde vorkommen. Ähnliche Alkaloidverteilungsmessungen an unterschiedlich alten C. roseus Pflanzen aus verschiedenen Herkunftten brachten vergleichbare Ergebnisse.

Auf Grund der ungleichmäßigen Verteilung der Alkaloide wurde im folgenden die ganze Wurzel extrahiert, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten.

1.1.2 Kinetik des Serpentin- und Raubasingehaltes in C. roseus Pflanzen

Um den zeitlichen Verlauf der Alkaloidbildung festzustellen und einen geeigneten Erntetermin zu ermitteln, wurden 3-15 Wochen alte C. roseus Pflanzen, die in einwöchigem Abstand ausgesät worden waren (s. Methoden), auf ihren Alkaloidgehalt getestet. Es zeigte sich, daß der prozentuale Alkaloidgehalt (Alkaloid (mg)/g extrahiertes Trockengewicht) in Pflanzen, die älter als 45 Tage waren, relativ unverändert blieb. Aus diesem Grunde wurden die Pflanzen 45 Tage nach dem Auspflanzen in die Multitopfplatten geerntet.

1.1.3 Ergebnisse der durchgeführten Selektionsuntersuchungen

Für die Bestimmung des Alkaloidgehaltes wurde also auf Grund der erzielten Ergebnisse die ganze Wurzel von jeweils 45 Tage alten C. roseus Pflanzen in Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden dann verdünnt und mit den Radioimmunoassays analysiert. Der Übersichtlichkeit halber werden die bei den Se-

lektionsuntersuchungen erzielten Ergebnisse zusammengefaßt dargestellt.

Abb. 7a zeigt die Häufigkeitsverteilung für Serpentin und Abb. 7b die für Raubasin von 136 Pflanzen aus 19 verschiedenen Herkunftten. Es waren große Unterschiede im Alkaloidgehalt der Pflanzen feststellbar.

Um zu überprüfen, ob diese nur modifikatorisch oder auch genetisch bedingt waren, wurden jeweils die zehn Pflanzen mit den höchsten Alkaloidgehalten geselbstet. Aus den Selbstungsgenerationen wurden dann wieder die Pflanzen mit den höchsten Alkaloidgehalten selektiert und geselbstet.

Mit den so erhaltenen Samen wurden Pflanzen der jeweiligen Selbstungsgenerationen angezogen und wieder mit Hilfe der RIA's analysiert. Es zeigte sich, daß eine beträchtliche Steigerung des Alkaloidgehaltes in der 1. Selbstungsgeneration erzielt worden war (s. Abb. 7a).

Die unterschiedlichen Gehalte der C. roseus Pflanzen der Elterngeneration waren also nicht nur modifikatorisch, sondern auch genetisch bedingt gewesen.

In der zweiten Selbstungsgeneration konnte jedoch, verglichen mit der ersten, nur noch eine leichte Steigerung der Alkaloidproduktion festgestellt werden, während in der dritten Selbstungsgeneration der durchschnittliche Alkaloidgehalt der Pflanzen sogar wieder abnahm (s. Abb. 7b).

Die Ergebnisse zeigen, daß aus C. roseus Pflanzen verschiedener Herkunftten durch Selektion Stämme mit stark erhöhter Alkaloidproduktion gewonnen werden konnten. Es ist nur noch in der zweiten und nicht mehr in der dritten Selbstungsgeneration gelungen, den Alkaloidgehalt dieser Stämme durch weitere Selektionszüchtungen zu steigern.

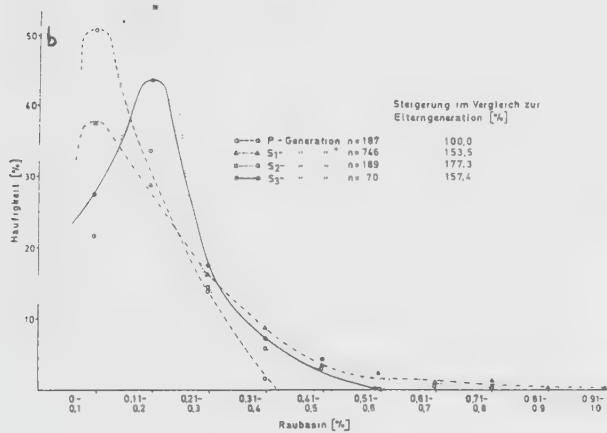
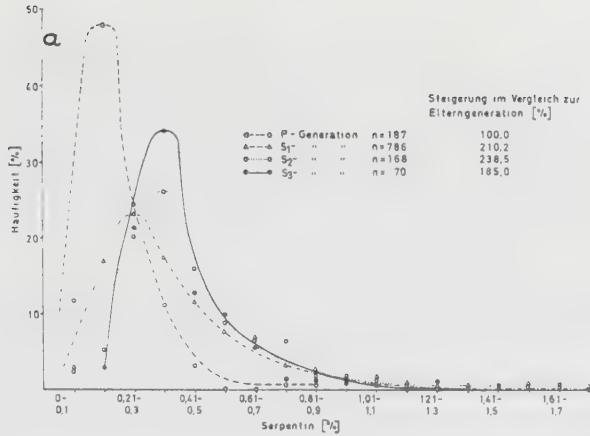


Abb. 7a-b: Häufigkeitsverteilungen für den Alkaloidgehalt einer *C. roseus* Population aus 19 verschiedenen Herkünften und den 1. 2. und 3. Selbstungsgenerationen der zehn hieraus selektierten Pflanzen mit den höchsten Alkaloidgehalten

- a) Häufigkeitsverteilungen für den Serpentinegehalt
b) Häufigkeitsverteilungen für den Raubasingehalt

Um zu testen, ob die auf diese Weise selektierten C. roseus Hochleistungsstämme auch im Freiland vergleichbar hohe Alkaloidgehalte aufweisen, müßten sie in klimatisch geeigneten Gebieten (in Deutschland ist ein Freilandanbau nicht möglich) angebaut werden. Die Alkaloidgehalte dieser und auf kommerzieller Basis angebauter Pflanzen könnten dabei dann eventuell verglichen werden.

Einige C. roseus Pflanzen aus in Bochum selektierten Hochleistungsstämmen wurden in Israel angebaut, das ein für die Kultivierung von C. roseus Pflanzen günstiges Klima hat. Die Pflanzen wuchsen unter den dort herrschenden Bedingungen gut und hatten zum großen Teil die erwarteten hohen Alkaloidgehalte. Damit konnte gezeigt werden, daß die in der Klimakammer selektierten Hochleistungsstämme auch im Freiland überdurchschnittlich produzieren.

2. Aufbau eines Radioimmunoassays für Ajmalin

Mit dem in Kaninchen erzeugten Antiserum und dem zur Verfügung stehenden ^3H Ajmalin konnte der Ajmalin RIA aufgebaut werden. Zuerst wurden geeignete Inkubationsbedingungen für die Antigen-Antikörperreaktion und ein geeignetes Trennverfahren für die Trennung der gebundenen von den freien Antigenen ermittelt. Nachdem die optimalen Testbedingungen geschaffen worden waren, wurden die Eigenschaften der Antiserumfraktionen untersucht und der RIA standardisiert. Anschließend wurde die Spezifität des Tests ermittelt. Diese Untersuchungen wurden besonders umfassend durchgeführt, um ein Maß für die Richtigkeit der mit dem RIA erzielten Ergebnisse zu besitzen.

2.1 Herstellung des Ajmalininmunogens

Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 1000 sind nicht immunogen (Hurn und Landon, 1971), das heißt, sie sind nicht in der Lage, in geeigneten Tieren eine Antikörperbildung zu induzieren. Eines der kleinsten Moleküle, gegen das Antikörper gebildet wurden, ist Vasopressin (M.G. 1098) (Wu et al., 1969). Eine Methode, auch gegen Substanzen mit einem M.G. < 1000 Antikörper zu erzeugen, beschreibt Landsteiner (1945), indem er kleine Moleküle (Haptene) an große Carrier Moleküle koppelte. Geeignete Tiere, denen diese Konjugate eingespritzt wurden, erzeugten auch Antikörper gegen die niedermolekularen Substanzen.

Nicht alle Haptene besitzen geeignete funktionelle Gruppen ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$ etc.), über die das Molekül direkt an ein Makromolekül kovalent gebunden werden kann. In vielen Fällen muß daher ein für eine Kopplung geeignetes Haptenderivat synthetisiert werden. Sehr häufig werden Haptenderivate mit einer freien Carboxylgruppe benutzt, die dann an NH_2 -Gruppen des Carrier-Proteins gebunden werden kann. Einen Einblick in die Fülle der verschiedenen Möglichkeiten, ein Hapten an

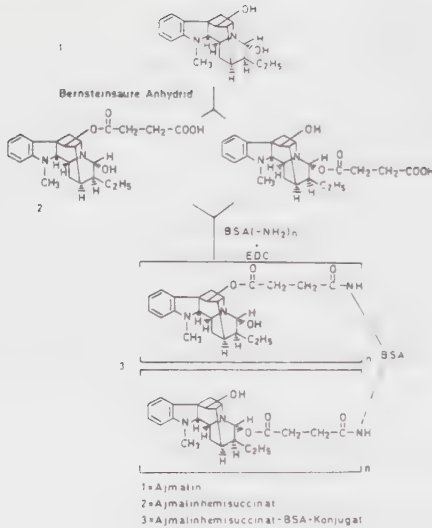


Abb. 8: Syntheschema des Ajmalin-Immunogens

ein Carrier-Protein zu koppeln, gibt Erlanger (1973) in seinem Übersichtsartikel.

Ajmalin hat das Molekulargewicht 326, es muß daher zur Antikörpererzeugung an ein Makromolekül gekoppelt werden. Da Ajmalin keine geeigneten funktionellen Gruppen für eine direkte Kopplung an ein Carrier-Protein besitzt, wurden die Hydroxylgruppen nach einer Synthese von Bite et al. (1963) mit Bernsteinsäureanhydrid verestert. Es entstand das C-17- und das C-21-Monosuccinat, deren freie Carboxylgruppen mit der Carbodiimid Reaktion an Bovinserumalbumin als Carrier-Protein gekoppelt wurden (Abb. 8).

Ajmalinhemisuccinat wurde nach folgender Synthese hergestellt:

1 g (0,0028 mol) Ajmalin und 1 g (0,0045 mol) Bernsteinsäureanhydrid wurden in 2,5 ml absolutem Pyridin eine Stunde lang unter dem Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 7,5 ml H₂O verdünnt, mit 4n HCL auf pH 4 eingestellt und dann dreimal mit 10 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden im Rotationsverdampfer auf 1 ml eingeengt und mit 2 ml Petroläther (40°-60°) versetzt. Das ausgefallene Ajmalinhemisuccinat wurde abgenutscht und aus Methanol auskristallisiert.

Die Ausbeute betrug 291 mg Ajmalinhemisuccinat. Der Schmelzpunkt lag bei 258°C - 260°C (Literatur: 260°C - 262°C, Bite et al., 1963).

Bovinserumalbumin und Humanserumalbumin werden von den meisten Arbeitsgruppen als Carrier-Proteine benutzt. Ihre Struktur ist bekannt, sie sind in reiner Form erhältlich und sie besitzen 59 für eine Kopplung besonders günstige ϵ -amino Gruppen vom Lysin. Die Peptidbindung zwischen einer Carboxylgruppe des Haptens und der ϵ -amino Gruppe wird hauptsächlich durch die gemischte Anhydrid Reaktion (Erlanger et al., 1957) oder die Carbodiimid Reaktion (Sheehan et al., 1955, Khorana, 1955) hergestellt.

Ajmalinhemisuccinat wurde über die Carbodiimid Reaktion mit Hilfe von EDC (1-ethyl-3-(3)-dimethyl-aminopropyl-carbodiimid HCL) an Bovinserumalbumin gekoppelt (s. Abb. 8). EDC wird von den Carbodiimiddervaten auf Grund seiner guten Wasserlöslichkeit und Stabilität bevorzugt für Konjugatsynthesen benutzt. Es reagiert nach einem nicht genau bekannten Mechanismus mit dem Carboxyl-Anion. Die so aktivierte Säure kann dann eine Peptidbindung mit NH₂-Gruppen des Bovinserumalbumins bilden. Das freiwerdende Wassermolekül wird vom EDC, das als Anhydrid des entsprechenden Harnstoffderivates aufgefaßt werden kann, aufgenommen.

Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt.

Lösung A: 50 mg (0,117 mmol) Ajmalinhemisuccinat in 5 ml
50% wässrigem Pyridin

Lösung B: 50 mg (0,321 mmol) EDC in 2,5 ml 50% wässrigem
Pyridin

Lösung C: 82 mg (0,00117 mmol) BSA in 5 ml H₂O

Unter konstantem Rühren bei Zimmertemperatur
wurde Lösung B tropfenweise im Zeitraum von drei
Minuten zu Lösung A gegeben. Nach weiteren zehn
Minuten wurde Lösung C ebenfalls tropfenweise
im Zeitraum von drei Minuten zu Lösung A pipettiert.

Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Zimmertemperatur ge-
rührt, anschließend 2 Tage gegen fließendes Leitungswasser
und 2 Tage gegen entionisiertes H₂O dialysiert und dann ge-
friergetrocknet. Die Ausbeute betrug 62,5 mg Ajmalinhemi-
succinat-BSA Konjugat.

Zur Ermittlung der Kopplungsrate (Anzahl der Moleküle Ajma-
linhemisuccinat pro Molekül BSA) und der Reinheit wurde
ein Aliquot der Konjugatlösung mit bekannter Proteinmenge
im Laufmittel Butanol: Eisessig: H₂O = 80:20:20 mit Ver-
gleichssubstanzen entwickelt. Das Chromatogramm wurde mit
dem Cer (IV) Ammoniumsulfat Sprühreagenz (Jakovljević et
al., 1964) behandelt, das Ajmalin rot anfärbt. Nur das Kon-
jugat, das am Start liegenblieb, wurde rot angefärbt, was
zeigte, daß 1. die Kopplung erfolgreich war und 2. sich kein
freies Ajmalinhemisuccinat (RF 0,55) mehr in der Konjugat-
lösung befand. Die Farbintensität des Konjugates und die
von angefärbten Standards wurden mit Hilfe des KM 3 Spektral-
photometers verglichen. Daraus ließ sich eine Kopplungsrate
von 2 - 3 Molekülen Ajmalinhemisuccinat pro Molekül BSA er-
rechnen. Die ermittelte Kopplungsrate ist nur ein Schätz-
wert, da nicht bekannt ist, ob gebundene Ajmalinmoleküle ge-
nauso stark chromogen wirken wie freie Moleküle.

2.2 Wahl geeigneter Testbedingungen zur radioimmunologischen Bestimmung von Ajmalin

Die Erzeugung von Antikörpern und die Anfertigung eines Tracers sind die wichtigsten Punkte bei der Herstellung eines Radioimmunoassays. Ebenfalls von entscheidender Bedeutung ist die Ermittlung einer geeigneten Technik für die Trennung der freien und der gebundenen Antigene. Bis zur praktischen Anwendung des Tests müssen dann noch optimale Bedingungen für die Antigen-Antikörperreaktion und für die Trenntechnik geschaffen werden. Diese Untersuchungen sind für jeden Radioimmunoassay getrennt auszuführen, weil verschiedene Antigen-Antikörpersysteme unter gleichen Bedingungen unterschiedlich reagieren.

2.2.1 Optimierung der Antigen-Antikörperreaktion

Die Antigen-Antikörperreaktion ist abhängig von der Inkubationszeit und -temperatur, von der Konzentration und Art des Carrier-Proteins sowie vom pH Wert der Inkubationslösung. Weiterhin kann die Menge und Art der im Puffer vorkommenden Ionen die Antigen-Antikörperreaktion beeinflussen. Der Effekt ist jedoch, verglichen mit dem pH-Einfluß, von untergeordneter Bedeutung (Vader et al., 1977).

Abb. 9c zeigt, daß die Bildung der Ajmalin-Antikörperkomplexe von pH Werten zwischen 7,3 und 11,0 nicht beeinflusst wurde. Die Reaktion wurde jedoch mit zunehmender Ansäuerung der Reaktionslösung immer stärker gehemmt. Es wurden folgende Puffersysteme benutzt, um die Inkubationslösungen auf den gewünschten pH Wert einzustellen: Acetat-Puffer pH 4-5,5, Phosphat-Puffer pH 6.0-8.0, Glycin-Puffer pH 8.5-11.0.

Die Rinderserumendkonzentration der Reaktionslösung hatte keinen maßgeblichen Einfluß auf die Ausbildung der Ajmalin-Antikörperkomplexe, sofern eine Konzentration von 0,2% nicht unterschritten wurde (s. Abb. 9b).

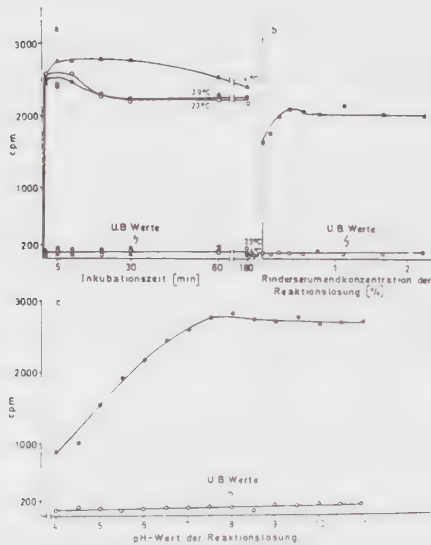
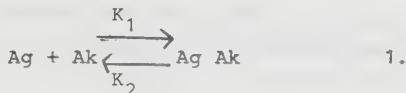


Abb. 9a-c: Abhängigkeit der Antigen-Antikörperreaktion von verschiedenen Parametern

- Zeitlicher Ablauf der Antigen-Antikörperreaktion bei verschiedenen Temperaturen
- Einfluß der Rinderserumkonzentration auf die Antigen-Antikörperreaktion
- Abhängigkeit der Antigen-Antikörperreaktion vom pH Wert der Reaktionslösung

Die Wirkungsweise von Carrier-Proteinen (Rinderserum) im Testansatz ist vielseitig. Sie ermöglichen eine optimale Antikörperfunktion, vermindern die Adsorption der Antikörper an Gefäßwände und spielen bei einigen Trenntechniken eine nicht unerhebliche Rolle bei der Fällung der Antigen-Antikörperkomplexe.

Antigen und Antikörper bilden Antigen-Antikörperkomplexe nach folgender Reaktion.



Die Reaktion ist abhängig von der Anzahl der Antigen- und Antikörpermoleküle. Zu Beginn werden viel mehr Komplexe gebildet, als wieder dissoziieren, weil K_1 beträchtlich größer ist als K_2 . Mit fortschreitender Reaktionszeit sind jedoch immer weniger freie Moleküle vorhanden, so daß schließlich nur noch so viele Komplexe gebildet werden, wie wieder zerfallen. Die Reaktion ist im Gleichgewicht. In der schnellen Anfangsreaktion können in hohem Maße auch unerwünschte Substanzen gebunden werden. Da diese durch die Hin- und Rückreaktionen wieder durch die natürlichen Antigene ausgetauscht werden, ist es für die Spezifität des Tests von entscheidender Bedeutung, daß das Reaktionsgleichgewicht erreicht ist.

Wie Abb. 9a zeigt, war beim Ajmalin RIA das Reaktionsgleichgewicht nach dreißig Minuten bei einer Temperatur von 23°C und 29°C erreicht, bei 4°C hatte es sich jedoch nach drei Stunden immer noch nicht eingestellt.

Auf Grund der oben aufgeführten Ergebnisse wurden beim Ajmalin RIA die Antigene und Antikörper 30 Minuten bei Zimmertemperatur im Phosphatpuffer pH 7.4 mit einer Rinderserumkonzentration von 1,1% inkubiert, da dadurch eine optimale Antigen-Antikörperreaktion gewährleistet war.

2.2.2 Auswahl und Optimierung der Trenntechnik

Alle Radioimmunoassays benötigen einen Trennschritt, da die Antigen-Antikörperkomplexe in den benutzten Konzentrationen nicht selbständig präzipitieren. Es sind sehr viele verschiedene Methoden beschrieben worden, die freien Antigene von den gebundenen zu trennen.

Eine angewandte Technik beruht auf der Fällung der Antigen-Antikörperkomplexe. Das kann mit einem zweiten Antikörper (Oddell et al., 1966) oder mit Chemikalien wie Äthanol (Oddell et al., 1965), Polyäthylenglykol (Desbuquois und Aurbach, 1971), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sonnenberg et al., 1976) u.a. Substanzen erreicht werden.

Eine andere Methode beruht auf der Adsorption der freien Antigene an Trägersubstanzen, wie dextranbeschichtete Holzkohle (Herbert, 1968).

Bei einer dritten Technik wird der Antikörper noch vor der Reaktion mit dem Antigen an die mit einem Adsorbens wie Polypropylen präparierte Wand des Reaktionsgefäßes gebunden (Porath und Wide, 1966).

Alle aufgeführten Trennmethoden haben ihre Vor- und Nachteile, und es hängt meistens von der Struktur des Antigens und vom angewandten Testsystem ab, welche Technik benutzt wird. Bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Radioimmuntests wurden die Antigen-Antikörperkomplexe mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt. Nach erfolgter Zentrifugation konnte der Überstand mit den freien Antigenen abdekantiert und anschließend der Niederschlag in 0,15 ml H_2O aufgelöst werden. Der große Vorteil dieser Trennmethode liegt darin, daß die Radioaktivität einer Probe mit Hilfe von nur 1 ml Szintillator gezählt werden konnte (s. auch Methoden). Bei anderen Trenntechniken werden mindestens fünf ml Szintillationsflüssigkeit pro Probe verbraucht. Bei einem Vergleich mit der Holzkohletrennung konnten keine entscheidenden Unterschiede entdeckt werden (Arens, 1976).

Eine optimale Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist abhängig von der Konzentration des Salzes in der Reaktionslösung und der Inkubationszeit und -temperatur nach der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Zugabe.

Abb. 10a zeigt, daß die Ammoniumsulfatendkonzentration der Inkubationslösung mindestens 48%ig sein sollte. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration war nicht sinnvoll, da dann auch die unspezifischen Bindungswerte anstiegen, weil freies ^3H Antigen mit ausgefällt wurde. Die Fällung verlief nur optimal bei einer Temperatur von 23°C . Sie war bei dieser Temperatur nach wenigen Minuten im Gleichgewicht (Abb. 10b).

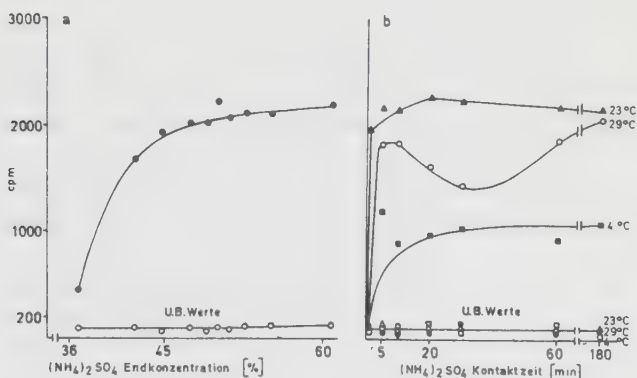


Abb. 10a-b: Abhängigkeit der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung von verschiedenen Parametern.

- Einfluß der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Endkonzentration der Reaktionslösung auf die Antigen-Antikörperfällung
- Zeitlicher Ablauf der Antigen-Antikörperfällung bei verschiedenen Temperaturen

2.3. Charakterisierung der Antiseren

Antiseren werden charakterisiert durch ihren Titer, ihre Affinität und Spezifität. Der Titer gibt die Verdünnung des Antiserums an, das einen bestimmten Prozentsatz (in der Regel

zwischen 30% und 50%) des eingesetzten Tracers bindet. Er beeinflusst die Richtigkeit der RIA Ergebnisse nicht. Antiseren mit hohem Titer sind aber deshalb nicht erwünscht, weil der Titer die Anzahl der Proben limitiert, die mit einem bestimmten Antiserumvolumen getestet werden können.

Die Antikörperaffinität ist gekennzeichnet durch die Reaktionsenergie zwischen den Antikörperbindungsstellen und dem Antigen. Sie beeinflusst in der Praxis die Empfindlichkeit, die mit dem RIA erreicht werden kann. Die Gleichgewichtskonstante der Antigen-Antikörperreaktion und damit die Stärke der Affinität kann aus Standardkurvendaten nach Scatchard (1949) ermittelt werden (s. Kapitel 5.4). Ein für die Praxis wichtiger Vergleich der Antikörperaffinitäten verschiedener Antiserumfraktionen wird durch die Bestimmung der Menge an unmarkiertem Antigen, die benötigt wird, um 50% des markierten Antigens vom Antikörper zu verdrängen, ermöglicht (Dawson, 1978).

Die Spezifität ist das wichtigste Kriterium eines Antiserums, denn nur mit spezifischen Antiseren können richtige RIA-Bestimmungen durchgeführt werden. Ein Maß für die Spezifität sind die Kreuzreaktionen der Antikörper gegen andere Substanzen als das natürliche Antigen. Sie werden bestimmt, indem Standardkurven für das Antigen und für strukturverwandte Substanzen aufgestellt werden. Aus den Standardkurven werden dann die Substanzmengen bestimmt, die 50% des markierten Antigens von den Antigen-Antikörperkomplexen verdrängen. Sie werden mit der zur Erreichung des gleichen Effektes benötigten unmarkierten Antigenmenge verglichen. Da die Substanzen sich in ihren Molekulargewichten teilweise recht stark unterscheiden, werden die Kreuzreaktionen auf molarer Basis gemäß folgender Formel berechnet (Landon, 1976).

$$KR (\%) = \frac{\text{pmol Antigen bei } \frac{B}{Bo} = 50\%}{\text{pmol Testsubstanz bei } \frac{B}{Bo} = 50\%} \times 100$$

Die oben aufgeführten Parameter sind nicht nur von der Immunisierungstechnik (Nieschlag et al., 1975, Dawson et al., 1978) und der Tierart (Odell et al., 1972), sondern auch vom Einzeltier und von der Immunisierungszeit abhängig. Das Ziel der folgenden Untersuchung war, für einen RIA besonders geeignete Antiserumfraktionen zu finden. Deshalb wurden vom Kaninchen Nr. 65 zwanzig und von den Kaninchen Nr. 63 und 64 je fünf Antiserumfraktionen, die jeweils 7 Tage nach einer Boosterinjektion gewonnen worden waren, untersucht. Dabei war festzustellen, wie stark der Titer, die Affinität und Spezifität der Antiseren von der Immunisierungszeit und vom Einzeltier abhängig sind und ob es Zusammenhänge zwischen der Größe dieser Parameter gibt. Von jeder Antiserumfraktion wurden also verschiedene Verdünnungen mit einer bestimmten Tracer-menge inkubiert, um den Titer zu ermitteln. Bei der Titerbestimmung wurden auch die 14 Tage nach einer Boosterinjektion gewonnenen Antiseren berücksichtigt. Danach wurden Standardkurven für Ajmalin und Sandwicin, dem C-17 Isomeren des Ajmalins, aufgestellt, um die Affinität und Spezifität der einzelnen Antiseren zu bestimmen.

Die Abb. 11a₁₋₃ zeigt, daß sich die zur Antiserumcharakterisierung benutzten Parameter nicht nur während der Immunisierungszeit (hauptsächlich auf Grund der Boosterinjektionen und der Konstitution des Tieres) änderte, sondern auch vom Genotyp des Einzeltieres abhängig war. Es war jedoch keine systematische Zu- oder Abnahme des Titers, der Affinität und Spezifität zu erkennen.

In Abb. 11a₁ ist zu sehen, daß sich die 7 bzw. 14 Tage nach der Boosterinjektion gewonnenen Antiseren in ihrem Titer insgesamt nur unwesentlich unterschieden. Dagegen hatten die Boosterinjektionen große Auswirkungen auf die Veränderung dieses Parameters. Die höchsten Titer lagen zwischen 1:100 und 1:180 und traten beim Tier Nr. 64 nach der zweiten und beim Tier Nr. 65 nach der vierten Boosterinjektion auf. Das Kaninchen Nr. 63 zeigte dagegen keine ausgeprägten Titermaxima.

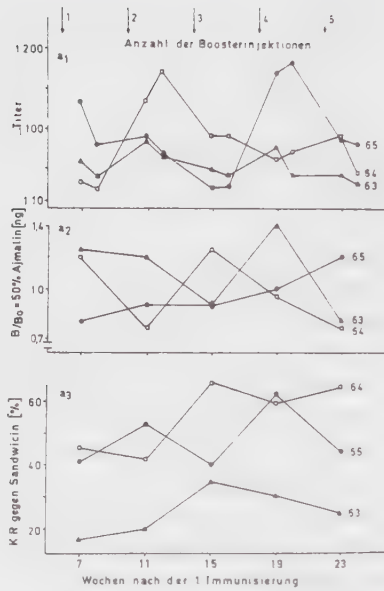


Abb. 11a₁₋₃: Änderungen der zur Charakterisierung der Antiseren der Kaninchen Nr. 63, 64 und 65 benutzten Parameter während der Immunisierungszeit von 23 Wochen

- a₁) Verlauf des Titers
- a₂) Entwicklung des $B/B_0 = 50\%$ Wertes der mit den entsprechenden Antiseren aufgestellten Standardkurven
- a₃) Änderungen der Kreuzreaktionen gegen Sandwicin

Die $B/B_0 = 50\%$ Werte der mit den verschiedenen Antiseren aufgestellten Standardkurven unterschieden sich, verglichen mit Titer oder Spezifität, nur unwesentlich (Abb. 11a₂).

Die Spezifität der Antiseren war, wie Abb. 11a₃ zeigt, weniger von der Immunisierungszeit als vielmehr vom Einzeltier abhängig. Alle Antiseren des Kaninchens Nr. 63 waren spezifischer als die der anderen Tiere und daher, obwohl sie einen niedrigeren Titer besaßen, im Normalfall für die Aufstellung eines RIA's am geeignetsten. Der Zusammenhang zwischen niedrigem Titer und hoher Spezifität (Kaninchen Nr. 63) konnte sich bei ähnlichen Untersuchungen nicht bestätigen (s. Kapitel 4.3).

Um die Entwicklung der charakteristischen Antiserumparameter auch über einen längeren Zeitraum als ca. 6 Monate zu beobachten, wurden die im Laufe von ca. 20 Monaten gewonnenen Antiseren des Kaninchens Nr. 65 untersucht (Abb. 11b). Insgesamt gesehen waren keine dramatischen Veränderungen im Laufe der Immunisierungszeit festzustellen.

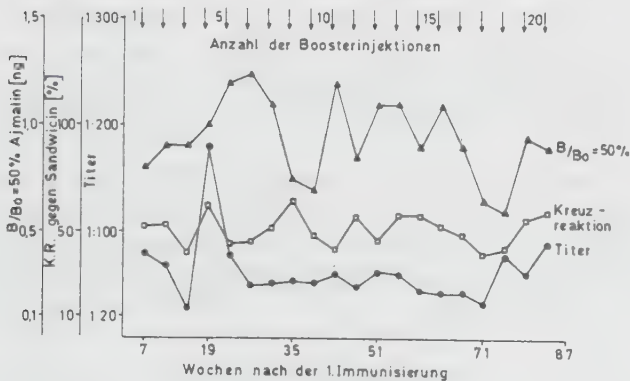


Abb. 11b: Änderungen der oben aufgeführten Parameter für die Antiseren des Kaninchens Nr. 65 während der Immunisierungszeit von 83 Wochen.

Die nach der ersten und der zwanzigsten Boosterinjektion gewonnenen Antiserumfraktionen waren für die Aufstellung eines Radioimmunoassays beinahe gleich gut geeignet. Es ist also möglich, mit einem Kaninchen über Jahre Antiseren gleicher Güte zu erzeugen.

2.4 Standardisierung des Tests

Für die Quantifizierung der RIA Bestimmungen dient eine Standardkurve. Sie wird erstellt, indem eine konstante Anzahl Antikörper- und markierter Antigenmoleküle mit einer steigenden bekannten Menge unmarkiertem Antigen inkubiert wird. An Hand der Radioaktivitätsabnahme der Antigen-Antikörperkomplexe (s. Einleitung) kann eine Standardkurve erstellt werden. Es sind eine Vielzahl verschiedener graphischer Darstellungen beschrieben worden. Bei den meisten wird die Antigenmenge auf der Abszisse logarithmisch aufgetragen. Für die Ordinate kann beispielsweise die gemessene Radioaktivität (cpm), die $B/F(\%)$ Rate (Quotient aus gebundenem und freiem Antigen) oder die $B/B_0(\%)$ Rate (B_0 und B repräsentieren die Radioaktivitäten der Proben ohne bzw. mit unmarkiertem Antigen) benutzt werden (Cook, 1975).

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Darstellungen ermöglicht die logit-log Transformation (Rodbard, 1974) eine lineare Auftragung, mit deren Hilfe der lineare Meßbereich genau bestimmt werden kann. Nur dieser Bereich sollte für eine Auswertung benutzt werden.

Abb. 12 zeigt die Ajmalin-Standardkurve in der B/B_0 und der logit-log Auftragung. Die charakteristischen Parameter der Standardkurven sind der lineare Meßbereich, der $B/B_0 = 50\%$ Wert, die Steigung der logit-log Geraden und die Größe der unspezifischen Bindung.

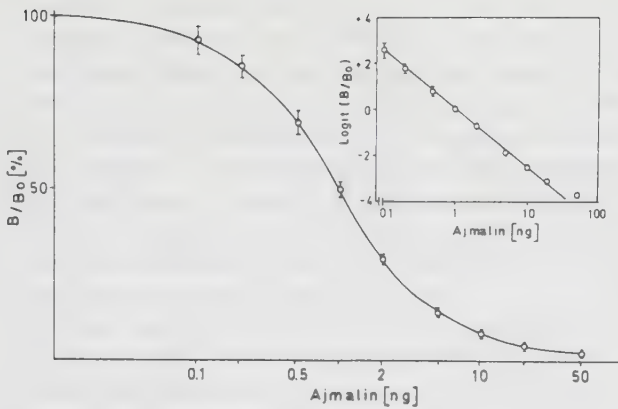


Abb. 12: Ajmalin-Standardkurve (n=14) in zwei möglichen Auftragungen.

Der $B/B_0 = 50\%$ Wert gibt die Menge an unmarkiertem Antigen an, die benötigt wird, um die Hälfte der markierten Antigene vom Antikörper zu verdrängen. Er ist somit ein Maß für die Empfindlichkeit des Tests.

Tab. 5 zeigt die oben erwähnten charakteristischen Standardkurvenparameter für den Ajmalin RIA an. Die Daten erlauben den Schluß, daß der Test für den Nachweis von ng-Mengen Ajmalin geeignet ist.

Linearer Bereich der logit-log Geraden	$B/B_0 = 50\%$	Steigung der logit-log Geraden	U.B. Werte
0,2 ng - 10 ng	1,01 ng	-2,5	1,5%

Tab. 5: Wichtige Parameter zur Beschreibung der Ajmalin-Standardkurve.

Die Empfindlichkeit eines RIA's ist nicht nur von der spezifischen Aktivität des Tracers, von der Antiserumfraktion (s. Kapitel 2.3) und von optimalen Reaktionsbedingungen (s. Kapitel 2.2) abhängig, sondern auch von der Menge des in jedem Test eingesetzten Antiserums und Tracers. Für eine Sensitivitätssteigerung kann die Konzentration der beiden Reaktanden gleichmäßig oder einzeln erniedrigt werden. Letztere Methode führt zu ungünstigen B/F Raten, deshalb wurde die Menge der Ajmalinantikörper und des ^3H Ajmalins gleichmäßig verringert. Abb. 13 zeigt die außerordentliche Empfindlichkeitssteigerung des Tests, die mit dieser Methode erreicht werden konnte. Würden weniger als 1200 cpm Gesamtradioaktivität pro Probe eingesetzt, so wären die erhaltenen Standardkurven nicht mehr reproduzierbar. Eine Sensitivitätssteigerung des RIA's ist immer dann von Bedeutung, wenn besonders geringe Substanzmengen erfaßt werden müssen, wie beispielsweise bei Ajmalinverteilungsmessungen in Pflanzen oder bei der Ajmalinbestimmung in R. vomitoria Gewebekulturen (s. Kapitel 3.1. und 3.2).

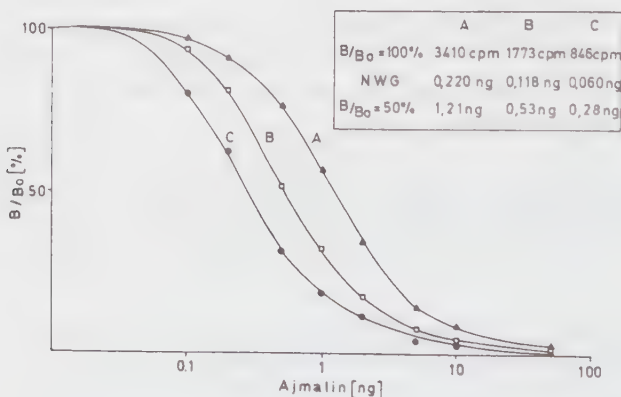


Abb. 13: Änderung der Sensitivität der Standardkurve durch Variation der Antigen- und Antikörpermenge bei konstantem Antigen-Antikörper Verhältnis. Die Nachweisgrenze (NWG) wurde gemäß folgender Formel bestimmt:

$$\frac{B}{B_0} = 100\% - 3 \times S_{100\%}$$
 ($S_{100\%}$ = Standardabweichung von B/B_0 bei $B = B_0$)

2.5 Untersuchungen zur Spezifität des Tests

Alle Alkaloide, für die in dieser Arbeit die Erstellung von Radioimmuntests beschrieben werden, wurden direkt, d.h. ohne vorherige Reinigung, aus den Extrakten und Filtraten radioimmunologisch bestimmt. Diese Lösungen enthielten jedoch nicht nur das gewünschte Alkaloid, sondern auch eine Vielzahl strukturverwandter und isomerer Substanzen, teilweise in weit höheren Konzentrationen als die gesuchte Verbindung. Deshalb mußte als wichtigste Forderung an den Test eine hohe Spezifität gestellt werden.

Die Spezifität kann durch optimale Reaktionsbedingungen (s. Kapitel 2.2) und durch die Immunisierungstechnik mit anschließender Auswahl der Antiserumfraktionen (s. Kapitel 2.3) verbessert werden. Sie ist aber primär abhängig von der Kopplung an BSA, d.h. über welche funktionelle Gruppe das Hapten an das Protein gebunden worden ist (Exley et al., 1971, Lindner et al., 1972, Kuss et al., 1972, Den Hollander et al., 1974). Der Grund liegt darin, daß Antikörper gegen verschiedene antigene Determinanten des Haptens gebildet werden, hauptsächlich aber gegen die, die nicht in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle liegen (Landsteiner, 1945). Antikörper reagieren also auch mit Molekülen, die sich im Kopplungsbereich von dem Antigen, gegen das sie gebildet wurden, unterscheiden. Da Ajmalin über das Hemisuccinat gekoppelt wurde (s. Abb. 8), waren höhere Kreuzreaktionen gegen C-17 Derivate und C-17 Isomere zu erwarten. Die Kreuzreaktionen der Antikörper gegen andere Substanzen dienen als Maß für die Spezifität des Tests (Methoden zur Bestimmung und Berechnung der Kreuzreaktionen siehe Kapitel 2.3).

2.5.1 Bestimmung von Kreuzreaktionen der Ajmalinantikörper gegen andere Indolalkaloide

Im Hinblick auf die geplante Anwendung des Ajmalin RIA'S wurden Kreuzreaktionen gegen die Alkaloide bestimmt, die in Rauwolfia Arten, speziell in R. vomitoria, entdeckt wurden. Nach Iwu und Court (1977) kommen in R. vomitoria hauptsächlich Indolalkaloide vom Yohimbin-, 18-Hydroxy-Yohimbin-, Heteroyohimbin-, Sarpagin- und Ajmalintyp vor.

Tab. 6 gibt die Kreuzreaktionen der Ajmalinantikörper gegen alle in R. vomitoria vorkommenden Isomere und C-17 Derivate des Ajmalins sowie für mindestens ein Alkaloid aus den anderen Indolalkaloidgruppen an. Wie bereits angenommen wurde, reagierten die Antikörper sehr stark mit den Ajmalinisomeren und dem C-17 Derivat, Monochloracetyljmalin, das sich in der Reaktivität vom natürlich vorkommenden Acetyljmalin nicht unterscheiden dürfte. Die gegen die anderen Alkaloide getesteten Kreuzreaktionen sind sehr gering und können vernachlässigt werden. Abb. 14 zeigt, daß die Ajmalinantikörper

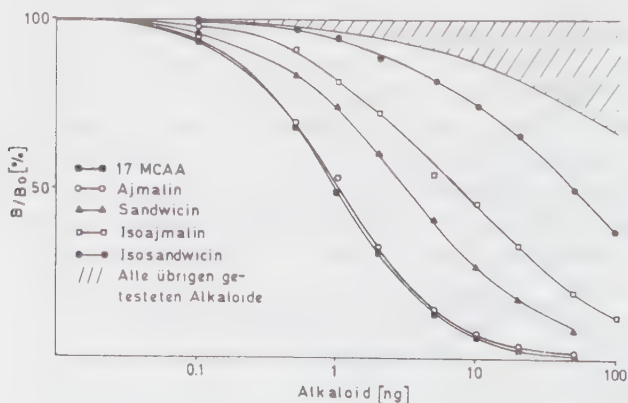
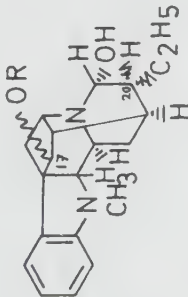


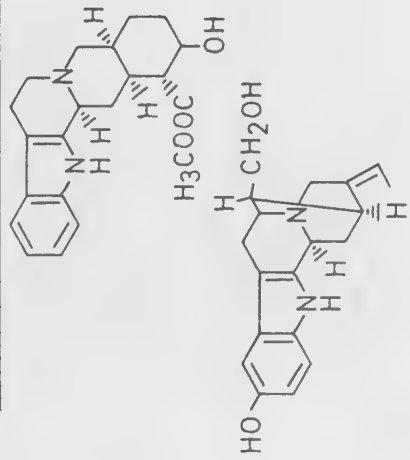
Abb. 14: Kreuzreaktionen der Ajmalinantikörper gegen andere Indolalkaloide

Struktur des Alkaloids Indolalkaloid= R Konfiguration Name K.R. (%)
 gruppe OH in C- 17 H in C- 20

	Ajmalin- Typ	H	β	α	Ajmalin	100
	"	OCOCH ₂ Cl	β	α	17-Monochlor- acetyl- ajmalin	90.4
	"	H	α	α	Sandwicin	30.9
	"	H	β	β	Isoajmalin	12.8
	"	H	α	β	Isosandwicin	2.0

Struktur des Alkaloids

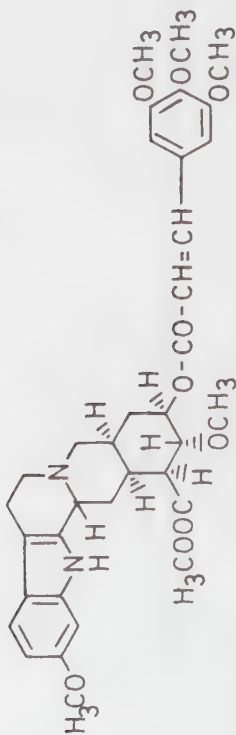
Indolalkaloidgruppe R Name K.R. (%)



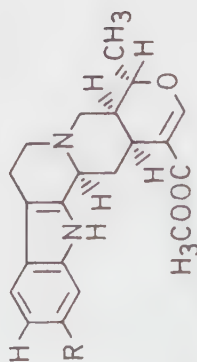
Yohimbin-Typ α - Yohimbin < 0.2

Sarpagin-Typ Sarpagin < 0.2

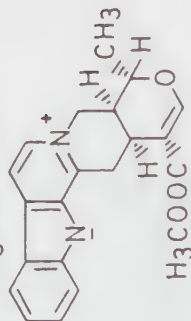
18- Hydroxy-Yohimbin-Typ Rescinnamin<0.2



Heteroyohimbin- Typ H Tetrahydro-
alstonin <0.2
OCH₃ Reserpinin <0.2



Anhydronium Basen Alstonin <0.2



Tab. 6: Kreuzreaktionen der Ajmalinantikörper gegen andere in R. vomitoria vorkommende Alkaloide, in % bezogen auf molarer Basis.

gegen das C-17 Derivat die höchste Kreuzreaktion aufwiesen, dann folgten, wie theoretisch zu erwarten war, das C-17 Isomer Sandwicin, das C-20 Isomer Isoajmalin und das C-17, C-20 Isomer Isosandwicin.

Da Ajmalin von den Alkaloiden des Ajmalin-Typs in R. vomitoria das Hauptalkaloid ist, braucht an Hand dieser Ergebnisse keine entscheidende Störung bei der Ajmalinbestimmung von R. vomitoria Pflanzen- oder Gewebekulturextrakten befürchtet zu werden.

2.5.2 Bestimmung der Verteilung von immunreaktivem Material auf dem Chromatogramm eines R. vomitoria Wurzel- und Stengelextraktes

Es bestand jedoch noch die Möglichkeit, daß hier nicht untersuchte oder zugängliche Alkaloide, Alkaloidvorstufen oder andere in R. vomitoria vorkommende Substanzen den Test störten. Deshalb wurde folgender Versuch durchgeführt.

Ein Wurzel-Stengel Gemisch einer differenzierten R. vomitoria Pflanze wurde in 5 ml 80% Methanol bei 60°C über Nacht im Wasserbad extrahiert. Bei dieser Extraktionsmethode wurden alle Alkaloide quantitativ extrahiert, wie Zweit- und Drittextraktionen des gleichen Pflanzenmaterials zeigten. Ein Aliquot des Extraktes wurde in einer 7 cm langen Bande auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und zusammen mit Vergleichssubstanzen im Laufmittel Aceton:Petroläther (40°C - 60°C):Diäthylamin = 20:70:10 entwickelt. Nach dem Trocknen der Platte wurden 16 Banden ausgeschnitten, die 1 cm breit waren. Das Kieselgel der Banden wurde ausgekratzt und die Substanzen mit je fünf ml 80% Methanol eluiert. Die Eluate wurden dann verdünnt und mit dem Ajmalin RIA auf immunreaktive Substanzen getestet.

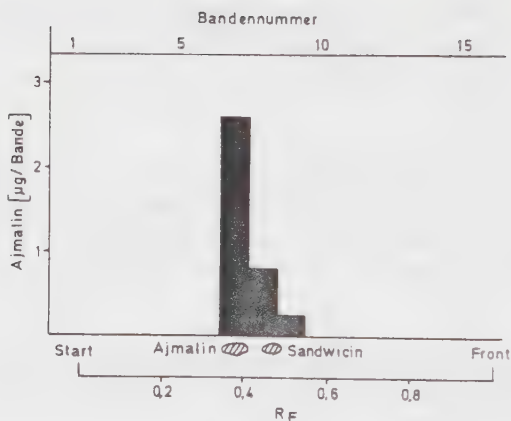


Abb. 15: Verteilung von immunreaktivem Material auf dem Chromatogramm eines R. vomitoria Wurzelextraktes.

In Abb. 15 ist zu sehen, daß die Banden 7, 8 und 9 Immunreaktivität aufwiesen. Knapp 30% der Gesamtimmunreaktivität war auf das C-17 Isomere Sandwicin zurückzuführen, das die immunogene Substanz der Banden 8 und 9 bildete. Der Prozentsatz lag wahrscheinlich noch niedriger, da ein Teil der Immunreaktivität der Bande 8 auf verschlepptes Ajmalin zurückzuführen sein dürfte.

Dieses Ergebnis bestätigt das vom vorigen Kapitel, und es steht zweifelsfrei fest, daß die mit dem Ajmalin RIA durchgeführten Bestimmungen auf keinen Fall mehr als 30% durch andere immunogene Substanzen in den Extraktlösungen erhöht werden, wodurch eine ausreichende Spezifität des Tests gewährleistet ist.

2.5.3 Korrelation von RIA Bestimmungen und Messungen mit dem Zeiss Spektralphotometer KM 3

In den beiden vorigen Kapiteln ist die Spezifität und damit Gültigkeit der RIA Bestimmungen intern, d.h. mit den Methoden des RIA's selbst, bewiesen worden. Im folgenden Versuch wurde die Richtigkeit der radioimmunologisch erhaltenen Ergebnisse auf externem Wege mit der fluorimetrischen Bestimmung gezeigt.

Fünf Wurzelextrakte von verschiedenen, differenzierten R. vomitoria Pflanzen wurden, wie im vorigen Kapitel beschrieben, in 80% Methanol extrahiert. Aliquote Teile der Extrakte wurden auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und im Laufmittel Aceton:Petroläther (40°C - 60°C):Diäthylamin = 20:70:10 entwickelt. Die Ajmalinbestimmung erfolgte mit dem Zeiss Spektralphotometer KM 3 wie im Methodenteil beschrieben. Dann wurden die Extrakte verdünnt und mit dem Ajmalin RIA analysiert.

Aus den Ergebnissen wurde der Korrelationskoeffizient für die fluorimetrische und radioimmunologische Bestimmung $r = 0,941$ und die Gleichung für die Regressionsgerade $y = 1,6 x - 0,14$ errechnet. Die Daten zeigen, daß die beiden Analyseverfahren eng korreliert waren. Die höheren Analysewerte bei der RIA Bestimmung waren nur zum Teil auf die in den vorigen Kapiteln festgestellten Kreuzreaktionen zurückzuführen. Es schien sich vielmehr um einen systematischen vom einzelnen RIA unabhängigen Effekt zu handeln, der schon bei anderen ähnlichen Korrelationsexperimenten aufgetreten war (Weiler, 1977, Arens, 1976).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Spezifität dieses RIA's völlig ausreicht, um richtige Ajmalinbestimmungen zu gewährleisten. Es ist also nicht notwendig, die Filtrate und Extrakte vorzureinigen, was sehr zeitaufwendig wäre und damit den erwünschten Probendurchsatz nicht erlauben würde.

3. Anwendung des Radioimmunoassays für Ajmalin

Die Anwendungsmöglichkeiten des Ajmalin RIA's werden im folgenden an Ajmalinverteilungsuntersuchungen von Rauwolfia Arten sowie an der Optimierung einer R. vomitoria Gewebekultur demonstriert.

3.1 Verteilung von Ajmalin in R. vomitoria und anderen Rauwolfia Arten

Je eine differenzierte R. vomitoria, R. verticillata und R. tetraphylla Pflanze wurden in 0,5 cm - 4 cm lange Stengel- und Wurzelstücke zerlegt, die ebenso wie Blattstücke in 5 ml Methanol bei 58°C im Wasserbad über Nacht extrahiert wurden. Wie im Kapitel 2.5.3 schon erwähnt, führte diese Methode zu einer vollständigen Extraktion von Ajmalin. Die Extrakte wurden verdünnt und mit dem Ajmalin RIA analysiert.

Abb. 16 zeigt die Verteilung von Ajmalin in einer differenzierten R. vomitoria Pflanze. Der Ajmalingehalt ist auf 1 g Frischgewicht bzw. 1 g extrahiertes Trockengewicht bezogen. In der Wurzel sind die höchsten Alkaloidmengen feststellbar, wobei die Ajmalinkonzentration vom Wurzelhals bis zur Spitze der Hauptwurzel kontinuierlich zunimmt. Die grünen Pflanzenteile enthalten dagegen nur vergleichsweise geringe Ajmalinmengen.

In den beiden anderen untersuchten Rauwolfia Arten konnte eine ähnliche Ajmalinverteilung festgestellt werden. Auch hier war das Alkaloid fast ausschließlich in der Wurzel gefunden worden und die Konzentration des Ajmalins stieg zur Wurzelspitze hin an.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß Ajmalin, wie auch Serpentin und Raubasin in Catharanthus roseus (s. Kapitel 1.1.1), fast ausschließlich in der Wurzelrinde vorkommt. Um die Ajmalinverteilung in Nebenwurzeln zu untersuchen, wurden 0,2 mm -

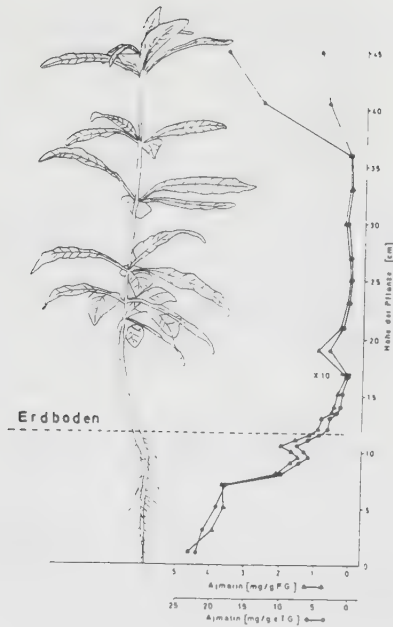


Abb. 16: Verteilung von Ajmalin in der Wurzel und im Stengel einer differenzierten *R. vomitoria* Pflanze

0,4 mm dicke Nebenwurzeln aus dem Wurzelhalsbereich in 1,5 cm - 3 cm lange Abschnitte zerteilt, extrahiert und die Extrakte mit dem RIA analysiert.

Abb. 17 zeigt, daß die Nebenwurzeln einen insgesamt höheren Ajmalingehalt (bezogen auf 1 g extrahiertes Trockengewicht) aufwiesen als die Hauptwurzel. Die mittleren Abschnitte der drei untersuchten Nebenwurzeln hatten überdurchschnittliche Ajmalingehalte.

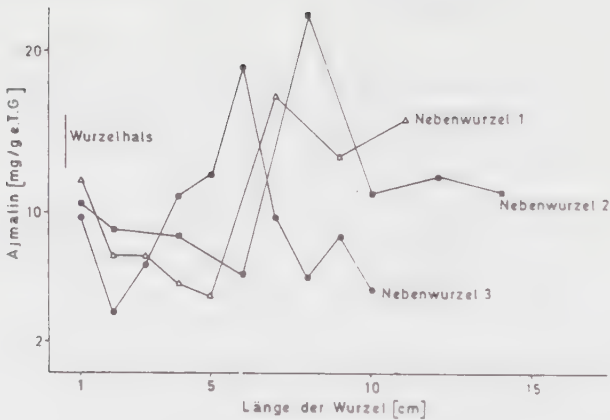


Abb. 17: Verteilung von Ajmalin in 1 mm - 4 mm dicken Nebenwurzeln aus der Wurzelhalsregion einer differenzierten *R. vomitoria* Pflanze

Da Ajmalin in den Wurzeln nicht gleichmäßig verteilt war, wurden bei der Ajmalinbestimmung von *Rauwolfia* Pflanzen die ganzen Wurzeln extrahiert.

Tab. 7 gibt an, daß *R. vomitoria* Pflanzen im Vergleich zu *R. tetraphylla* und *R. verticillata* Pflanzen die höchsten Alkaloidgehalte aufwiesen. Sie wurden deshalb für die Anlage von Gewebekulturen benutzt, da erwartet werden konnte, daß sich die genetisch bedingte höhere Alkaloidproduktion auch in der Gewebekultur ausdrückt.

<u>Rauwolfia</u> Art	Alter der unter- suchten Pflanzen (Monate)	Anzahl der untersuchten Pflanzen	Durchschnittlicher Ajmaliningehalt (mg/g e.T.G.)
<u>R. vomitoria</u> Afz.	5 - 6	15	7,5 $\pm$ 1,3
<u>R. tetraphylla</u> L.	5 - 6	2	2,2 $\pm$ 0,4
<u>R. verticillata</u> Baill.	5 - 6	2	0,6 $\pm$ 0,1

Tab. 7: Durchschnittliche Ajmaliningehalte von 5 - 6 Monate
alten R. vomitoria, R. tetraphylla und R. verticillata
Pflanzen

3.2 Optimierung des Ajmaliningehaltes von Rauwolfia vomitoria Gewebekulturen

Der RIA ist erstmalig von Zenk et al. (1977) für die Optimierung von Gewebekulturen eingesetzt worden. Es gelang, in C. roseus Suspensionskulturen sehr hohe Serpentin- und Raubasingehalte zu erreichen. Auf Grund der hohen Sensitivität und Spezifität der RIA's war es möglich gewesen, nicht vorbehandelte Gewebekulturextrakte zu analysieren, was den für eine Optimierung notwendigen hohen Probendurchsatz erlaubte.

Im folgenden soll die Anwendbarkeit des RIA's für die Optimierung von Gewebekulturen an einem weiteren Beispiel, nämlich der Ajmalinoptimierung von Rauwolfia vomitoria Gewebekulturen, gezeigt werden.

Es wurde versucht, den Ajmaliningehalt von R. vomitoria Gewebekulturen durch Medienoptimierung zu erhöhen, wobei folgendermaßen vorgegangen wurde.

R. vomitoria Gewebekulturen wurden in 15 verschiedenen Medien angezogen. Aus diesen wurden die drei, die die höchsten Alkaloidproduktionen ermöglichten, ausgewählt und ihre Saccharose-

konzentration optimiert. Anschließend wurde versucht, die Alkaloidbildung in diesen Medien durch Zusatz von L-Tryptophan zu erhöhen.

Zu diesem Zweck wurden 15 verschiedene Medien mit 2 cm³ Inoculum aus der gleichen Vorkultur angeimpft. Die Ernte erfolgte nach 24 Tagen. Das Gewebe wurde vom Filtrat, das vergleichsweise nur sehr geringe Ajmalinmengen enthielt, durch Abnutschen getrennt und in 80% Äthanol am Rückfluß 20 Minuten extrahiert. Zweit- und Drittextraktionen zeigten, daß Ajmalin vollständig extrahiert war. Die Extrakte wurden verdünnt und mit dem Ajmalin RIA getestet.

Tab. 8 gibt den Einfluß der verschiedenen Medien auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion der R. vomitoria Gewebekulturen an, die bei 30°C und 23°C angezogen wurden. Es ist ersichtlich, daß beide Parameter sowohl vom benutzten Medium als auch von der Temperatur abhängig waren.

Die Alkaloidproduktion war bei 30°C insgesamt gesehen höher und das Wachstum stärker als bei 23°C. Die Medien B₅C_M, Ni und R ermöglichten der Gewebekultur die höchsten Alkaloidproduktionen. Um eine weitere Steigerung der Produktion zu erreichen, wurden verschiedene Saccharose- und Tryptophankonzentrationen dieser Medien getestet. Ernte und Aufarbeitung der Proben erfolgte wie oben beschrieben.

Es ist aus Tabelle 9 ersichtlich, daß die üblichen Saccharosekonzentrationen im Ni- und R-Medium für die Alkaloidbildung bereits optimal bzw. fast optimal waren, während im B₅C_M Medium durch eine höhere Konzentration an Saccharose (7%) der Alkaloidgehalt fast verdoppelt werden konnte.

L-Tryptophan wurde den drei Medien in den Konzentrationen von 50 mg - 500 mg/l Medium zugesetzt.

Medium	Literatur- angabe	30°C		23°C	
		T.G. (g/l Med.)	Ajmalin (mg/l Med.)	T.G. (g/l Med.)	Ajmalin (mg/l Med.)
4x	Gamborg et al. (1968)	9,6	1,9	2,6	0,16
DAX	Zenk, pers.Mitt.	9,2	1,7	5,4	0,36
NAX	Zenk, pers.Mitt.	4,5	1,4	5,4	2,90
B ₅ C ₂	Zenk, pers.Mitt.	5,4	1,9	3,1	0,40
B ₅ C _M	Zenk, pers.Mitt.	10,0	8,1	6,5	0,16
LS	Linsmaier u.Skoog (1965)	4,7	2,9	8,6	1,50
LSD	Zenk, pers.Mitt.	4,2	0,7	3,2	0,24
VM	Zenk, pers.Mitt.	0,9	0,1	1,3	0,10
Z	Zenk, pers.Mitt.	2,2	4,1	1,7	4,20
He	Zenk, pers.Mitt.	2,5	3,1	6,6	1,50
B1	Blaydes (1966)	5,0	0,6	3,2	0,64
56	Zenk, pers.Mitt.	5,0	0,1	6,2	0,64
White	Carew (1975)	2,7	0,4	3,2	0,20
Ni	Nitsch u. Nitsch (1969)	2,6	5,4	0,9	4,50
R	Zenk et al. (1977)	4,2	6,0	3,1	1,60

Tab. 8: Wachstum und Ajmalinproduktion von R. vomitoria
Gewebeulturen bei verschiedenen Temperaturen in
15 unterschiedlichen Medien.

Abb. 18 zeigt, daß die Alkaloidbildung im Medium R durch den Zusatz von 300 mg Tryptophan pro l Medium um den Faktor 8 gesteigert werden konnte. Bei höheren Konzentrationen wirkte Tryptophan toxisch, worauf die Abnahme des Alkaloidgehaltes und des Wachstums zurückzuführen ist. Zenk et al. (1977) hatten die Alkaloidbildung von C. roseus Gewebekulturen im gleichen Medium R ebenfalls durch Zusatz von Tryptophan (300 mg/l Medium) um ca. 300% steigern können.

Medium	R	Ni	B ₅ C _M
normale Saccharose- konzentration (%)	5	2	2
optimale Saccharose- konzentration (%)	6	2	7
Steigerung der Alkaloid- produktion (%)	139	-	190

Tab. 9: Steigerung der Alkaloidproduktion im R, Ni und B₅C_M Medium durch die Optimierung der Saccharosekonzentration

In den beiden anderen Medien konnte durch Tryptophanzusatz keine Erhöhung der Ajmalinproduktion erzielt werden, was verdeutlicht, daß die Effektorwirkung von Tryptophan durch andere Medienkomponenten aufgehoben werden kann.

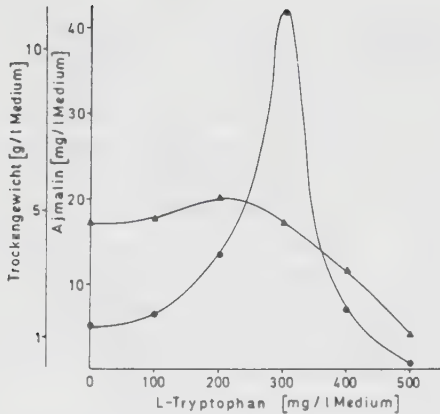


Abb. 18: Einfluß der Tryptophankonzentration im R-Medium auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion von R. vomitoria Gewebekulturen.

Es ist mit diesen Ergebnissen gezeigt worden, daß die radioimmunologische Analyse auch für die Optimierung von R. vomitoria Gewebekulturen bestens geeignet ist. Es sind hierdurch jedoch erst die Grundlagen für die Anlage von R. vomitoria Gewebekulturen mit interessanter Ajmalinproduktion geschaffen worden. Um dieses Ziel zu erreichen, muß das Medium weiter optimiert werden. Darüber hinaus müssen geeignete Selektionstechniken entwickelt werden, die mit Hilfe der radioimmunologischen Analyse die Erfassung von Hochleistungsstämmen mit veränderten Geno- oder Phaenotypen ermöglichen.

4. Aufbau der Ergotamin- und Ergocristin Radioimmunoassays

Im folgenden wird die Synthese der Ergotamin und Ergocristin Immunogene beschrieben. Mit den Immunogenen wurden in Kaninchen nach der vorgestellten Immunisierungstechnik (s. Methoden) Antikörper erzeugt. Die Peptidalkaloid RIA's konnten mit den Antiseren und den zur Verfügung stehenden Tracern aufgebaut werden. Wie beim Ajmalin RIA wurden optimale Testbedingungen ermittelt, die Antiserumfraktionen charakterisiert, die Radioimmunoassays standardisiert und ihre Spezifität untersucht. Mit den in diesem Kapitel und den im Kapitel 5 erstellten Tests konnte der Radioimmunoassay zum erstenmal für die Bestimmung von Pilzinhaltsstoffen bei der Selektion von Hochleistungsstämmen und der Optimierung von saprophytischen Pilzkulturen eingesetzt werden.

4.1 Synthese der Ergotamin- und Ergocristin Immunogene

Die Peptidergotalkaloid Immunogene wurden über die Mannich Reaktion hergestellt. Als Mannich Reaktion bezeichnet man die Umsetzung eines Aldehyds (meist Formaldehyd) mit einem primären oder sekundären Amin und einer C-H aciden Verbindung, wie Ketone, Aldehyde usw.. Darüber hinaus lassen sich aber auch Aromaten wie Indol aminomethylieren. Deshalb fand die Reaktion große Anwendung in der Indolchemie, wie beispielsweise bei der Synthese von Gramin (Kost et al., 1964). Die bevorzugte Reaktionsstelle ist das C-3. Ist diese Position aber substituiert wie bei den Ergotalkaloiden, so wird N-1 aminomethyliert (Georgian, 1957).

Der Mechanismus der Reaktion ist folgendermaßen:

Die NH_2 -Gruppen des Bovinserumalbumins reagieren zunächst mit dem Formaldehyd unter Ausbildung eines Kations mit delokalisierter positiver Ladung, das einen stickstoffanalogen Formaldehyd darstellt (Carlin und Moores, 1959). Durch elektrophile Substitution am N-1 im essigsäuren Medium entstehen dann die Alkaloid-BSA-Konjugate (s. Abb. 19).

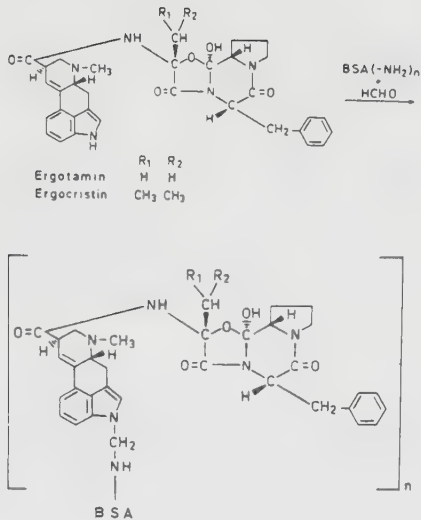


Abb. 19: Syntheseweg der Ergotamin- und Ergocristininimmunogene

Die Synthese des Kopplungsproduktes wurde wie folgt durchgeführt:

Lösung A: 50 mg (0,78 μmol) BSA wurden in 1 ml destilliertem H_2O und 0,5 ml 3M Natriumazetatlösung gelöst. Dazu wurde unter Rühren bei Zimmertemperatur 0,5 ml 37% Formaldehydlösung tropfenweise im Zeitraum von drei Minuten dazugegeben. Der Ansatz wurde weitere zehn Minuten gerührt.

Lösung B: 57,1 mg (0,078 mmol) Ergotaminditartrat und ca. 1,5 $\mu\text{Ci}^3\text{H}$ Ergotaminditartrat bzw. 47,5 mg (0,078 mmol) Ergocristin und ca. 1,2 $\mu\text{Ci}^3\text{H}$ Ergocristin wurden in 1,5 ml Dimethylsulfoxid und 0,5 ml Essigsäure gelöst.

Lösung B wurde innerhalb von fünf Minuten tropfenweise zu Lösung A pipettiert. Der Ansatz wurde dann drei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, anschließend 1 Tag gegen H_2O :Dioxan=1:1, zwei Tage gegen Leitungswasser und einen Tag gegen destilliertes H_2O bei 4°C dialysiert und dann gefriergetrocknet.

Die Ausbeute betrug 42,1 mg Ergotamin-BSA-Konjugat und 39,5 mg Ergocristin-BSA-Konjugat. Durch Chromatographie der Kopplungsprodukte im Laufmittel Chloroform:Äthanol=92:8 konnte gezeigt werden, daß kein freies Ergotamin bzw. Ergocristin mehr in der Lösung vorhanden war. Die Konjugate fluoreszierten, wie Ergotamin und Ergocristin, im langwelligen U.V. Licht stark blau. An Hand der Radioaktivität der Konjugate wurde eine Kopplungsrate von 6,7 für das Ergotaminkonjugat und von 7,2 für das Ergocristinkonjugat bestimmt. Mit den Konjugaten wurden in Kaninchen mit der im Methodenteil angegebenen Immunisierungstechnik Antikörper erzeugt.

4.2 Wahl geeigneter Testbedingungen zur radioimmunologischen Bestimmung von Ergotamin und Ergocristin

Verschiedene Antigen- und Antikörpersysteme benötigen unterschiedliche Bedingungen für eine optimale Reaktion und für eine optimale Trennung der Antigene von den Antigen-Antikörperkomplexen. Deshalb bestand auch beim Ergotamin- und Ergocristin RIA die Notwendigkeit, diese Bedingungen zu ermitteln. Als Trenntechnik wurde wie bei allen anderen in dieser Arbeit beschriebenen RIA's die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung benutzt (s. Kapitel 2.2.2).

4.2.1 Optimierung der Antigen-Antikörperreaktion

Wie Abb. 20 zeigt, reagierten sowohl die Ergotamin- als auch die Ergocristinantikörper mit den entsprechenden Antigenen unter fast gleichen Reaktionsbedingungen optimal. Ein Ergebnis, das auf Grund der so ähnlichen Struktur der Peptidalkaloide und der für die Gewinnung der Antikörper benutzten Immunogene (s. Abb. 19) erwartet werden konnte.

Die Peptidalkaloid-Antikörperreaktion hatte ähnlich wie die Ajmalin-Antikörperreaktion nach ca. 30 min. ihr Gleichgewicht bei Zimmertemperatur erreicht (Abb. 20a).

Die Rinderserumendkonzentration der Lösung war ein sehr kritischer Faktor. Sie durfte für eine optimale Reaktion nicht weniger als 1% und nicht mehr als 2% betragen, da bei höheren Konzentrationen die unspezifische Bindung stark erhöht war (Abb. 20b).

Ein leichter Unterschied zwischen den beiden Antigen-Antikörper Systemen zeigte sich in der Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Bei Werten > 8 wurde die Antikörperreaktion gegen Ergotamin im Gegensatz zur Antikörperreaktion gegen Ergocristin, die relativ pH unempfindlich war, gehemmt (Abb. 20c).

Entsprechend der oben aufgeführten optimierten Testbedingungen wurden die Ergotamin- und Ergocristinantigene mit den entsprechenden Antikörpern 30 min. bei Zimmertemperatur in phosphatphysiologischem Puffer pH 7.4 mit einer Rinderserumendkonzentration von 1,11% inkubiert.

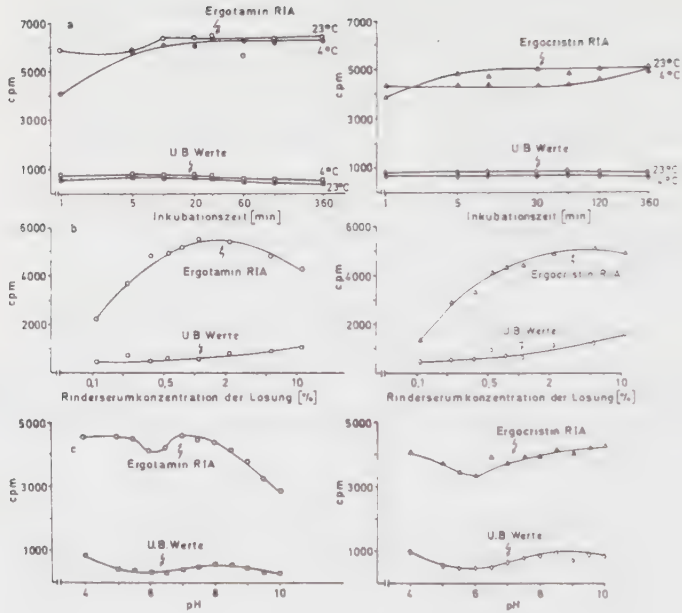


Abb. 20a-c: Abhängigkeit der Ergotamin- und Ergocristin-Antikörperreaktion von verschiedenen Parametern.

- Zeitlicher Verlauf der Antigen-Antikörperbildung in Abhängigkeit von der Temperatur
- Einfluß der Rinderserumkonzentration auf die Antikörperreaktion
- Einfluß des pH-Wertes der Reaktionslösung auf die Antigen-Antikörperreaktion

4.2.2 Optimierung der Trennmethode

Abb. 21 zeigt, daß beide Peptidalkaloid Radioimmuntests ebenfalls die gleichen Bedingungen für eine optimale Fällung benötigen. Die günstigste $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Endkonzentration lag zwischen 44% und 48% (Abb. 21a). Höhere Konzentrationen führten zu einem Anstieg der unspezifischen Bindung. Deshalb wurden die Peptidalkaloid-Antikörperkomplexe bei einer Ammoniumsulfatendkonzentration von 46% gefällt. Die Inkubationszeit nach der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Zugabe wurde auf 30 min. festgelegt. Längere Kontaktzeiten führten zu einem Anstieg der unspezifischen Bindung (Abb. 21b).

Bei einem Vergleich der Testbedingungen zur Bestimmung von Ajmalin und den Peptidalkaloiden zeigten sich wesentliche Unterschiede nur hinsichtlich der optimalen Rinderserum- und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Endkonzentrationen. Alle bisher besprochenen RIA's auf Indolalkaloide konnten also unter nahezu gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

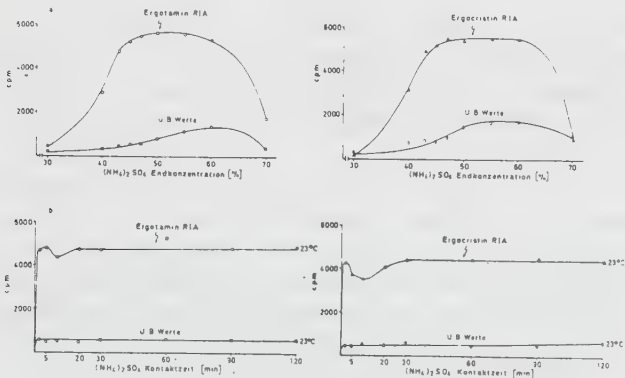


Abb. 21a-b: Abhängigkeit der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung der Ergotamin- und Ergocristinantikörperkomplexe von verschiedenen Parametern

- Einfluß der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sättigung der Reaktionslösung auf die Fällung der Antigen-Antikörperkomplexe
- Einfluß der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Kontaktzeit bei Zimmertemperatur auf die Fällung der Antigen-Antikörperkomplexe

4.3 Charakterisierung der Antiseren

Verschiedene Fraktionen der Ergotamin- und Ergocristinantiseren wurden, wie am Beispiel der Ajmalinantiseren im Kapitel 2.3 beschrieben, untersucht, um auch hier für einen RIA geeignete Antiseren zu finden. Mindestens fünf Antiserumfraktionen der Tiere Nr. 76 und Nr. 78 (Ergotamin) und Nr. 97, 98 und 101 (Ergocristin) wurden auf ihren Titer, ihre Affinität und Spezifität mit Hilfe der in Kapitel 2.3 angegebenen Methodik untersucht. Die Kreuzreaktionen der Ergotaminantikörper wurden gegen Ergocristin und die der Ergocristinantikörper gegen Ergotamin bestimmt.

Abb. 22a-c zeigt, daß die charakteristischen Eigenschaften der Ergotaminantiseren (Nr. 76, Nr. 78) im Gegensatz zu denen der Ergocristinantiseren (Nr. 97, Nr. 98, Nr. 101) weniger vom Einzeltier als vielmehr von der Immunisierungszeit (Kapitel 2.3) abhängig waren. Der Grund mag darin gelegen haben, daß die Tiere Nr. 76 und 78 Geschwistertiere waren.

Titermaxima, die zwischen 1:100 und 1:180 lagen, traten bei allen Tieren nach der 2. Boosterinjektion auf. Es bildeten sich teilweise auch mehrere Titermaxima aus, wie bei den Kaninchen Nr. 76 und 78 (Abb. 22a).

Abb. 22b zeigt, daß die $B/B_0 = 50\%$ Werte der mit den zuerst gewonnenen Antiseren der Tiere Nr. 76, Nr. 78 und Nr. 97 aufgestellten Standardkurven sehr hoch lagen. Um die Sensitivität des RIA's nicht unnötig herabzusetzen, wurden diese Antiseren nicht benutzt. Das für die Praxis wichtigste Ergebnis war, daß alle getesteten Antiserumfraktionen des Kaninchens Nr. 98 nicht nur einen höheren Titer besaßen, sondern auch spezifischer waren als die der anderen Tiere (Abb. 22c). Eine hohe Spezifität kann aber auch wie beim Tier Nr. 63 (Kapitel 2.3) mit einem niedrigen Titer gekoppelt sein.

Die in den Kapiteln 2.3 und 4.3 beschriebenen Ergebnisse zei-

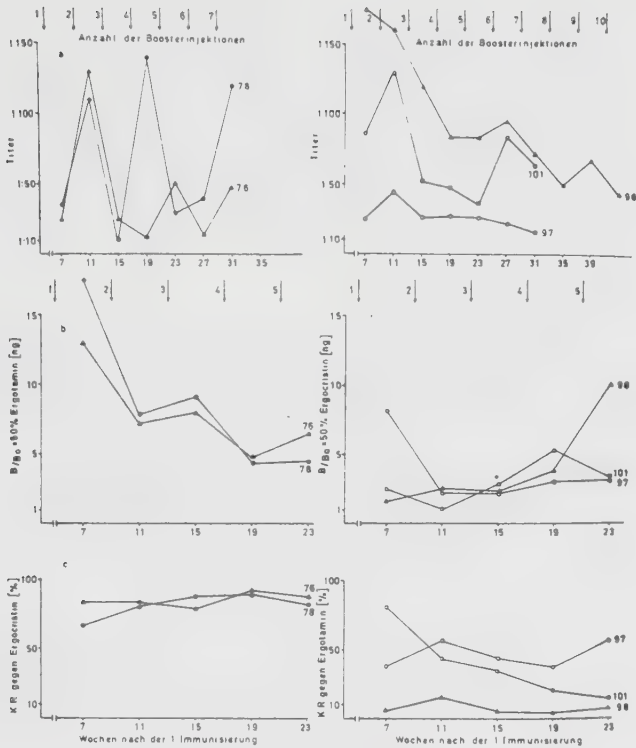


Abb. 22a-c: Veränderungen der zur Charakterisierung der Antiseren der Kaninchen Nr. 76, 78 (Ergotamin) und Nr. 97, 98, 101 (Ergocristin) benutzten Parameter während der Immunisierungszeit.

a) Verlauf der Titer der Antiserumfraktionen

b) Entwicklung des B/Bo = 50% Wertes der mit den entsprechenden Antiseren erstellten Standardkurven

c) Änderungen der Kreuzreaktionen gegen Ergotamin bzw. Ergocristin

gen, daß die Antiserumeigenschaften sehr stark von der Immunisierungszeit und vom Einzeltier beeinflußt werden. Es ist keine systematische Abhängigkeit beobachtet worden. Weiterhin ist keine Korrelation zwischen dem Titer, der Affinität und Spezifität festzustellen. Es ist also in den aufgezeigten Fällen vorteilhaft gewesen, alle Antiserumfraktionen auf ihre drei charakteristischen Parameter zu untersuchen, um ein für den Aufbau eines RIA's optimal geeignetes Antiserum zu erhalten.

4.4 Standardisierung der Tests

Die quantitative Auswertung beim Ergotamin und Ergocristin RIA erfolgte wie beim Ajmalin RIA mit Hilfe von Standardkurven, die für jeden Test neu aufgestellt wurden.

Die Abb. 23a und 23b zeigen die Ergotamin- und Ergocristin-Standardkurve in der B/B_0 (%) und der logit-log Auftragung. Die Parameter, die die Verläufe dieser Kurven beschreiben, sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

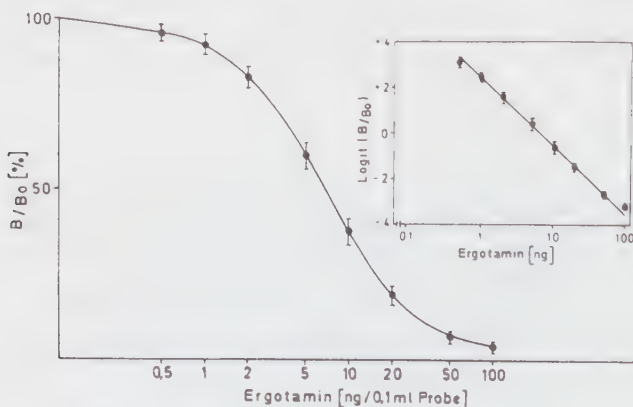


Abb. 23a: Ergotamin-Standardkurve (n=21) in zwei möglichen Auftragungen

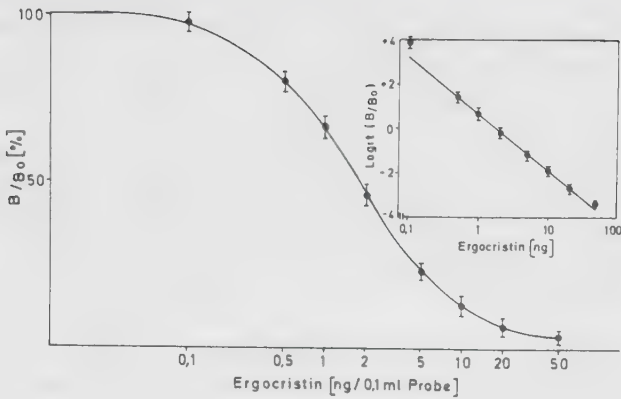


Abb. 23b: Ergocristin-Standardkurve (n=21) in zwei möglichen Auftragungen

RIA	linearer Abschnitt der logit-log Geraden	$B/B_0 = 50\%$	Steigung der logit-log Geraden	U.B. Werte
-----	--	----------------	--------------------------------------	---------------

Ergotamin	2ng- 50ng	6,80 ng	- 3,0	5%
-----------	-----------	---------	-------	----

Ergocristin	0,5ng- 20ng	1,78 ng	- 2,65	6%
-------------	-------------	---------	--------	----

Tab. 10: Wichtige Parameter zur Beschreibung des Verlaufs der Ergotamin- und Ergocristin-Standardkurven

Auf Grund der spezifischen Aktivität der eingesetzten Tracer (s. Methoden) war eine höhere Empfindlichkeit des Ergotamin RIA's zu erwarten. Wie die Daten zeigen, war jedoch das Gegenteil der Fall. Die Erklärung liegt darin, daß die Ergocristinantikörper eine höhere Affinität ($K_a = 0,15 \cdot 10^9 \frac{1}{\text{mol}}$) zum Ergotamin besitzen als die Ergotaminantikörper zum Ergocristin ($K_a = 1,32 \cdot 10^9 \frac{1}{\text{mol}}$). Zur Berechnung der Affinitätskonstanten siehe Kapitel 5.4. Die Ergebnisse zeigen nochmals deutlich, daß die Sensitivität des RIA's maßgeblich von der Antikörperaffinität und der spezifischen Aktivität des Tracers bestimmt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß beide RIA's die Forderung der hohen Sensitivität erfüllen. Es war für die bei der Anwendung der Tests (s. Kapitel 6) durchzuführenden Analysen nicht erforderlich, die Empfindlichkeit der Tests beispielsweise durch Herabsetzung der Antigen- und Antikörpermengen zu erhöhen.

4.5 Untersuchung der Spezifität der Tests

Da die Spezifität des RIA's entscheidend für die Richtigkeit der Bestimmungen ist, wurden auch beim Ergotamin- und Ergocristin RIA umfangreiche Untersuchungen zur Ermittlung der Spezifität der Tests unternommen. Es wurde dabei so vorgegangen wie bei der Bestimmung der Spezifität des Ajmalin RIA's (s. Kapitel 2.5).

4.5.1 Bestimmung der Kreuzreaktion der Antikörper gegen andere Ergotalkaloide

Es wurden Kreuzreaktionen gegen die wichtigsten natürlich vorkommenden Ergotalkaloide und einige synthetisch hergestellte Derivate unter Verwendung von Reinsubstanzen bestimmt. Tab. 11 gibt die Kreuzreaktion (%) der Ergotamin- und Ergo-

cristin sowie der spezifischen und polyspezifischen Lysergsäureantikörper an. Letztere wurden der Übersichtlichkeit halber in dieser Tabelle mit aufgeführt und werden erst im Kapitel 5.6.1 diskutiert.

Die Ergotamin- und Ergocristinantikörper zeigten keine Kreuzreaktionen gegen einfache Lysergsäurederivate und Clavine. Ein solches Ergebnis war zu erwarten, da die Alkaloide dieser Gruppen sich von den Peptidalkaloiden gravierend in dem Molekülteil unterscheiden, das der Kopplungsstelle genau gegenüberliegt (s. Kapitel 2.5.1).

Wie die Abb. 24a zeigt, reagierten die Ergotaminantikörper mit den Peptidalkaloiden Ergostin, Ergocristin und Dihydroergotamin fast ebenso gut wie mit Ergotamin selbst. Die hohen Kreuzreaktionen der Ergotaminantikörper waren nicht überraschend, da die relativ kompliziert gebauten Moleküle sich nur in einer bzw. zwei zusätzlichen Methylgruppen unterscheiden (s. Tab. 11). Die Kreuzreaktion der Ergocristinantikörper war mit ca. 26% gegen Ergostin und ca. 13% gegen Ergotamin vergleichsweise klein (Abb. 24b).

Die im Vergleich zu den Ergotaminantikörpern relativ hohe Spezifität der in den Test eingesetzten Ergocristinantikörper des Kaninchens Nr. 98 ist wahrscheinlich auf den Genotyp dieses Tieres zurückzuführen. Die Antiseren der mit dem gleichen Konjugat immunisierten "Ergocristinkaninchen" Nr. 97 und 101 zeigten die erwarteten hohen Kreuzreaktionen gegen Ergotamin (s. Abb. 22c).

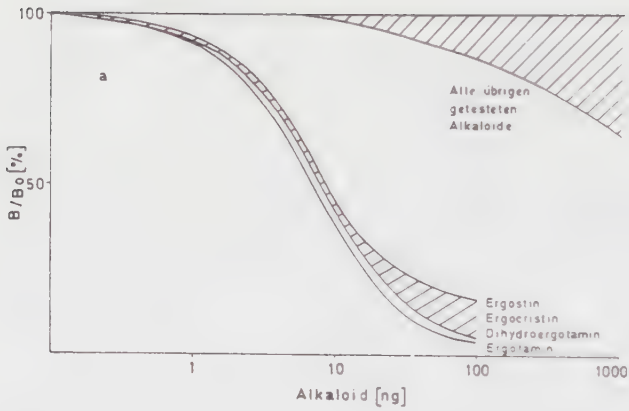


Abb. 24a: Bereiche der Kreuzreaktionen der Ergotaminantikörper gegen andere Alkaloide.

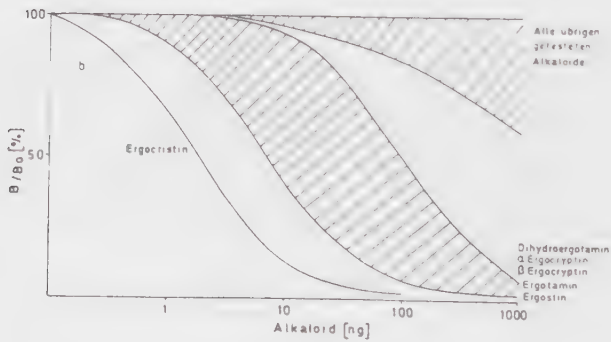
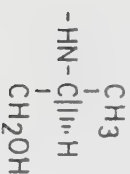
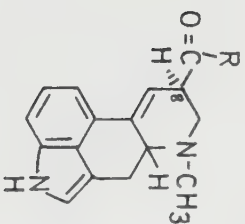


Abb. 24b: Bereiche der Kreuzreaktionen der Ergocristinantikörper gegen andere Alkaloide.

Grundstruktur R

Name K.R. K.R. K.R.
Ergocristin A.K. Ergotamin A.K. Lysergsäure A.K.
spez. unspez.



I. Einfache Lysergsäurederivate
Ergometrin < 0.2 < 0.2 < 0.1 53.0
(Ergobasin)
(Ergonovin)

-OH Lysergsäure < 0.2 < 0.2 100.0 100.0

-NH₂ Lysergsäure= < 0.2 < 0.2 < 0.1 57.0
amid

-NH₂ Isolyserg= < 0.2 < 0.2 < 0.1 19.6
säureamid +

+ epimer am C-8

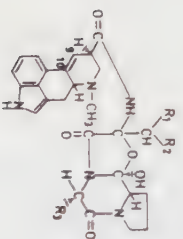
Tab. 11: Kreuzreaktionen der Ergotamin- und Ergocristinantikörper sowie der spezifischen und unspezifischen Lysergsäureantikörper gegen andere Alkaloid, ausgedrückt in % auf molarer Basis.

Grundstruktur

K.R. K.R. K.R.
Name Ergocristin Ergotamin Lysergsäure A.K.
A.K. spez. un spez.

R₁ R₂ R₃

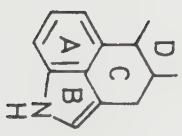
II. Peptidalkaloide



H	H	CH ₂ - 	Ergotamin	1/0.8	100.0	< 0.1	1.2
H	H	CH ₂ - 	Dihydroergotamin ⁺	1.9	87.0	< 0.1	0.6
H	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Dihydroergosin ⁺	< 0.2	< 0.2	< 0.1	0.3
H	H	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Ergosin	< 0.2	< 0.2	< 0.1	4.1
CH ₃ CH ₃	CH ₃ CH ₃	CH ₂ - 	Ergocristin	100.0	96.0	< 0.1	< 0.1
CH ₃ CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	α -	Ergocryptin	2.8	< 0.2	< 0.1	< 0.1
CH ₃ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	β -	Ergocryptin	4.3	< 0.2	< 0.1	0.5
H	CH ₃	CH ₂ - 	Ergostin	25.7	79.8	< 0.1	1.7

⁺9/10 Doppelbindung ist reduziert

Grundstruktur	Struktur von Ring D	Name	K.R. Ergocristin A.K.	K.R. Ergotamin A.K.	K.R. Lysergsäure A.K. spez. unsez.
---------------	---------------------	------	-----------------------------	---------------------------	--



III. Clavine

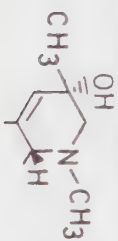
	Elymoclavin	< 0.2	< 0.2	< 0.1	32.8
	Lysergin	< 0.2	< 0.2	< 0.1	4.8
	Lysergol	< 0.2	< 0.2	< 0.1	52.6
	Isolysergol	< 0.2	< 0.2	< 0.1	5.0
	Lysergen	< 0.2	< 0.2	< 0.1	42.6

Struktur von
Ring D

K.R.
Ergocristin
A.K.

K.R.
Ergotamin
A.K.

K.R.
Lysergsäure A.K.
spez. unspez.



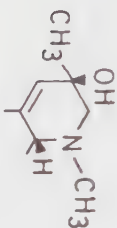
Setoclavin

< 0.2

< 0.2

< 0.1

< 0.1



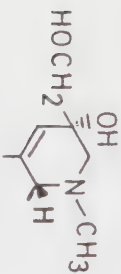
Isosetoclavin

< 0.2

< 0.2

< 0.1

5.1



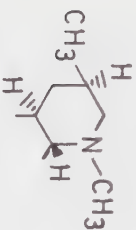
Penniclavin

< 0.2

< 0.2

< 0.1

0.8



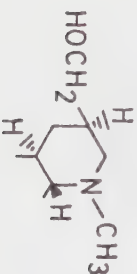
Festuclavin

< 0.2

< 0.2

< 0.1

2.7



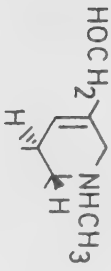
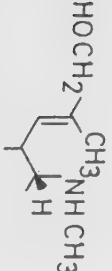
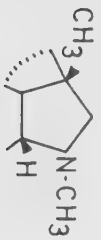
Dihydro-
lysergol I.

< 0.2

< 0.2

< 0.1

6.9

Struktur von Ring D	Name	K.R. Ergocristin A.K.	K.R. Ergotamin A.K.	K.R. Lysergsäure A.K. spez. unspez.
	Chanoclavin I.	< 0.2	< 0.2	< 0.1
	Chanoclavin II.	< 0.2	< 0.2	< 0.1
	Cycloclavin	< 0.2	< 0.2	< 0.1

Die Kreuzreaktionen der Antikörper gegen Dihydroergotamin und Ergostin verfälschen die Ergebnisse der radioimmunologischen Bestimmungen nicht, da Dihydroergotamin nicht natürlich vorkommt und Ergostin nur in einigen chemischen Rassen von Claviceps purpurea in Spuren nachgewiesen werden konnte (Hofmann, 1964).

Auf Grund der unterschiedlichen Größe der Kreuzreaktionen der Ergotaminantikörper mit Ergocristin (96%) und der Ergocristinantikörper mit Ergotamin (13%) konnten die beiden Peptidalkaloide aus einem Extrakt angenähert bestimmt werden, indem die Werte folgendermaßen berechnet wurden:

Ergebnis des Ergotamin RIA : x

Ergebnis des Ergocristin RIA : y

Ergocristin (A): $y - 0,13 (x - 0,96y)$

Ergotamin (B): $x - 0,96 \cdot A$

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl der Ergotamin als auch der Ergocristin RIA ausreichend spezifisch sind. Die Richtigkeit der RIA Bestimmungen wird durch andere in Claviceps Arten vorkommende Ergotalkaloide nicht entscheidend beeinflusst.

4.5.2 Bestimmung der Verteilung von immunreaktivem Material auf dem Chromatogramm von Sklerotienextrakten

Wie beim Ajmalin RIA sollte auch bei den Peptidalkaloid RIA's ausgeschlossen werden, daß nicht verfügbare Alkaloide, Alkaloidvorstufen oder andere in Sklerotien vorkommende Substanzen den Test stören. Aus diesem Grunde wurde folgender Versuch durchgeführt. Je ein Ergocristin enthaltendes Sklerotium (Nr. 220) der Herkunft U.K.I und ein Ergotamin enthaltendes Sklerotium (Nr. 1105) der Herkunft Indien II wurden zerschlagen (s. Kapitel 6.1.1). Das zerkleinerte Sklerotiummaterial wurde in 5 ml 50% wässriger Acetonlösung, die 2%

Weinsäure enthielt, über Nacht bei Zimmertemperatur extrahiert (Extraktionsmethode siehe Kapitel 6.1.1). Danach wurden die Sklerotienextrakte mit einer 5%igen NH_4OH Lösung alkalisiert (pH 8-9) und ein Teil der Extrakte im Verhältnis 1:1 gemischt. Aliquote Teile der drei Lösungen wurden in einer drei cm langen Bande auf eine in dreißig 0,5 cm breite Abschnitte eingeteilte Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und zusammen mit Vergleichssubstanzen im Laufmittel Chloroform:Äthanol = 92:8 entwickelt. Nach dem Trocknen wurde bei 313 nm Anregungswellenlänge mit dem Zeiss Spektralphotometer KM3 die Fluoreszenzverteilung auf den drei Chromatogrammbahnen wie im Methodenteil angegeben bestimmt (Abb. 25a).

Anschließend wurden die drei Chromatogrammbahnen ebenso wie die schon vorher eingeteilten 30 Banden aus dem Chromatogramm ausgeschnitten. Das Kieselgel der Banden wurde einzeln isoliert und die darin enthaltene Substanz mit 2 ml 80% Methanol über Nacht bei 4°C eluiert. Die Proben wurden dann verdünnt und mit den Peptidalkaloid RIA's auf immunreaktive Substanzen getestet.

Abb. 25b zeigt, daß der Ergotamin RIA in dem Extrakt von Sklerotium 1105, das kein Ergocristin enthielt, nur Ergotamin und Spuren von dem Isomeren Ergotaminin erfaßte. Im Mischextrakt der Sklerotien 220 und 1105 wurde erwartungsgemäß auch Ergocristin und das Isomere Ergocristinin gemessen.

Ergotaminin und Ergocristinin sind Zersetzungsprodukte, die bei der Sklerotienlagerung sowie bei der Extraktion und chromatographischen Auftrennung entstehen. Die zusätzlichen gefundenen Kreuzreaktionen gegen diese Substanz störten den Test auf Grund der geringen Konzentration nicht entscheidend.

Der Ergocristin RIA erfaßte auch im Mischextrakt der Sklerotien 220 und 1105 hauptsächlich Ergocristin und Ergocristinin und kaum Ergotamin und Ergotaminin, was auf Grund der geringen Kreuzreaktion gegen diese Substanz zu erklären ist (Abb.25c).

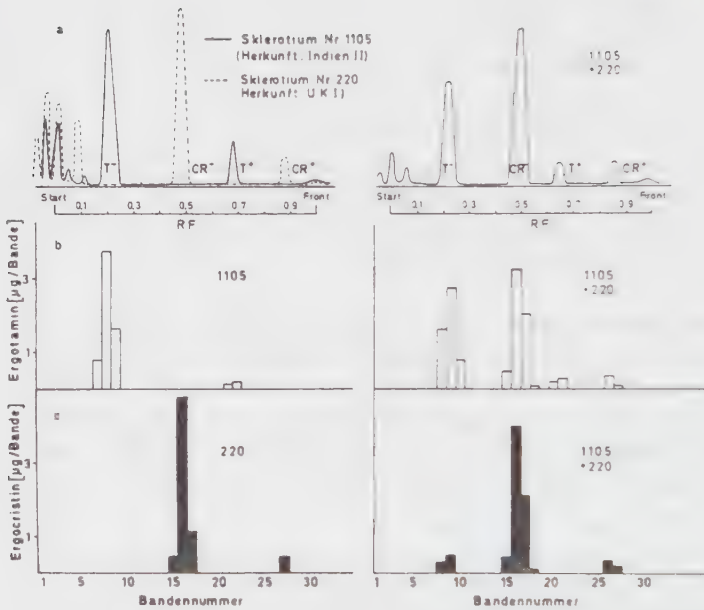


Abb. 25a-c: Dünnschichtchromatogramme von Extrakten aus Sklerotien der Herkünfte U.K.I (Ergocristin) und Indien II (Ergotamin) sowie eines Mischextraktes zweier Sklerotien aus den Herkunftsn Indien II und U.K.I

- a) Fluoreszenzintensitätsortskurven der Sklerotienextrakte
 - b) Verteilung von immunreaktivem Material gemessen mit dem Ergotamin-RIA
 - c) Verteilung von immunreaktivem Material gemessen mit dem Ergocristin-RIA
- T⁻ = Ergotamin, T⁺ = Ergotaminin
 CR⁻ = Ergocristin, CR⁺ = Ergocristinin

Die Ergebnisse zeigen, daß die radioimmunologischen Bestimmungen der Peptidalkaloide durch andere in dem Extrakt vorkommende Substanzen nicht wesentlich gestört werden.

4.5.3 Korrelation von radioimmunologischen und fluorimetrischen Bestimmungen

Auch für die Peptidalkaloid RIA's wurde ein externer Beweis für die Richtigkeit der Bestimmungen geführt, indem fluorimetrisch und radioimmunologisch erhaltene Ergebnisse miteinander verglichen wurden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen.

Die Alkaloidgehalte von je 100 Sklerotien der Herkünfte U.K.I (Ergocristin) und Indien II (Ergotamin) wurden mit den Radioimmuntests bestimmt. Dann wurden aus jeder Herkunft die zehn Sklerotien mit den höchsten und die zehn mit den niedrigsten Gehalten selektiert. Die Sklerotienextrakte wurden wie im vorigen Kapitel beschrieben hergestellt. Aliquote Teile der Extrakte wurden wieder im Laufmittel Chloroform:Äthanol = 92:8 entwickelt. Dann wurde die Alkaloidmenge fluorimetrisch wie im Methodenteil angegeben mit dem Spektralphotometer bestimmt.

Abb. 26 zeigt, daß die mit den beiden Analyseverfahren erzielten Ergebnisse sowohl für die Ergotamin- als auch für die Ergocristinbestimmung eng korreliert sind. Die schlechte Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden bei der Bestimmung von niedrigen Ergocristingehalten konnte auf die Kreuzreaktion der Ergocristinantikörper gegen Ergotamin zurückgeführt werden, da die entsprechenden Sklerotienextrakte kein Ergocristin, dafür aber Ergotamin enthielten.

Mit den oben aufgeführten Ergebnissen konnte die Richtigkeit der Bestimmungen und damit die Spezifität der Methode auch extern, d.h. im Vergleich mit der Fluorimetrie, gezeigt wer-

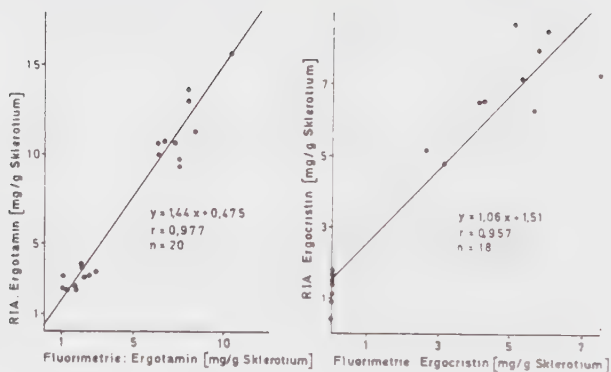


Abb. 26: Korrelation zwischen radioimmunologisch und fluorimetrisch bestimmten Ergotamin- und Ergocristingehalten von Sklerotien der Herkünfte Indien II und U.K.I

den. Die Peptidalkaloide konnten also aus nicht vorgereinigten Extrakten bestimmt werden, was den für Selektionsuntersuchungen (s. Kapitel 6) notwendigen Probendurchsatz ermöglichte.

5. Aufbau von Radioimmunoassays für Lysergsäure und einfache Lysergsäurederivate

Im folgenden wird die Synthese des für den Aufbau der Lysergsäure RIA's notwendigen Tracers beschrieben. Mit dem Tracer und den spezifischen und polyspezifischen Lysergsäureantisera konnten dann die entsprechenden Radioimmuntests erstellt werden. Wie bei den anderen beschriebenen RIA's wurden optimale Testbedingungen ermittelt, die Antiserumfraktionen charakterisiert, die Tests standardisiert und die Spezifität der RIA's untersucht.

5.1 Herstellung von markierter Lysergsäure

Neben einem geeigneten Antikörper ist der Tracer, das markierte Antigen, ein unerläßlicher Bestandteil eines Radioimmunoassays. Ein Tracer kann mit β -Strahlern wie ^3H und ^{14}C oder γ -Strahlern wie ^{125}J und ^{131}J radioaktiv markiert werden. Die Empfindlichkeit des Radioimmuntests ist unmittelbar abhängig von der spezifischen Aktivität des Tracers. Die meisten Antigene werden deshalb tritiert oder mit ^{125}J jodiert, weil nur mit diesen Isotopen eine genügend hohe spezifische Aktivität erreicht werden kann. Tracer mit hoher spezifischer Aktivität steigern die Empfindlichkeit des Tests, weil weniger unmarkierte Antigene benötigt werden, um die gleiche Anzahl markierter Antigene von den Antikörpern zu verdrängen. Eine Markierung mit ^{131}J führt zwar zu noch höheren spezifischen Aktivitäten, jedoch ist dieses Isotop auf Grund seiner geringen Halbwertszeit (8 Tage) ungeeignet.

Eine Jodmarkierung ist fast immer mit einer Veränderung der Struktur des Antigens verbunden, was negative Auswirkungen auf die Immunreaktivität des Moleküls haben kann (s. Kapitel 5.5). Dagegen unterscheiden Antikörper nur in Ausnahmefällen zwischen einem Antigen und seiner tritierten Form (Jeffcoate et al., 1975).

Ein weiterer Nachteil der Jodmarkierung liegt in der zwar gegenüber ^{131}J längeren, aber immerhin noch zu geringen Halbwertszeit von ^{125}J (60 Tage), das heißt, die Jodierungen müssen praktisch alle zwei bis drei Monate wiederholt werden.

^3H Tracer können bei regelmäßiger Reinigung über Jahre für einen RIA benutzt werden, da sie im allgemeinen stabil sind und die Halbwertszeit des ^3H 12,3 Jahre beträgt.

Bei Jodierungen werden spezifische Aktivitäten von 2200 - 4000 Ci/mmol erreicht, bei Tritierungen dagegen nur maximal 30 - 120 Ci/mmol, weshalb in der Regel mit einem Jodtracer aufgestellte Testsysteme empfindlicher sind. Das Jodisotop ist nahezu trägerfrei und kann deshalb mit seiner maximalen spezifischen Aktivität von 2160 Ci/mmol bezogen werden.

Ein schwerwiegender Nachteil beim Arbeiten mit ^3H markiertem Antigen ist der notwendige Gebrauch von Szintillationsflüssigkeit, was den Arbeitsaufwand erhöht und den Test wesentlich verteuert. ^{125}J kann dagegen in H_2O gelöst direkt in Gammazählern bestimmt werden.

Im folgenden wird die Synthese von ^3H und ^{125}J Lysergsäure beschrieben. Die Eigenschaften der mit diesen Tracern aufgebauten Lysergsäure RIA's werden dann in den Kapiteln 5.5 und 5.6 miteinander verglichen.

5.1.1 Synthese von ^3H Lysergsäure

^3H Lysergsäure wurde durch Hydrolyse des von Amersham-Buchler bezogenen ^3H Ergotaminditartrats (s. Material) gewonnen. Die Reaktion wurde nach der modifizierten Methode von Gröger et al. (1970) folgendermaßen durchgeführt:

Ca. 1,79 mCi (ca. 85 nmol) gereinigtes ^3H Ergotamin (Sp.A. 21,1 Ci/mmol), in 0,1 Methanol, wurde mit 1 ml 10% KOH am Rückfluß unter Stickstoff 40 min. lang zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf eine Kieselgeldünnschichtplatte (0,25 mm) bandförmig aufgetragen und im Laufmittel n-Propanol: H_2O = 70:30 entwickelt. Die ^3H Lysergsäurebande wurde ausgeschnitten und die Substanz mit 4 ml Äthanol eluiert.

Zur Überprüfung der Reinheit des Produktes wurde je ein Aliquot der Lösung in drei verschiedenen Laufmitteln entwickelt. Anhand der Radioaktivitätsverteilungen auf den Chromatogrammen konnte die Einheitlichkeit der aufgetragenen Substanz gezeigt werden. Es wurden ca. 40 μCi ^3H Lysergsäure gewonnen. Die spezifische Aktivität wurde nach der Self-Displacement Methode von Morris (1976) bestimmt. Sie beträgt 6,3 Ci/mmol. Die im Vergleich zum ^3H Ergotamin (Sp.A. 21,1 Ci/mmol) bedeutend niedrigere spezifische Aktivität der ^3H Lysergsäure ist durch den Austausch von Tritium- gegen Wasserstoffmoleküle bei der Hydrolysereaktion zu erklären.

5.1.2 Synthese von ^{125}J -Tyramin-Lysergsäure

Fast alle Proteine und größeren Peptide können direkt mit ^{125}J markiert werden, da sie jodierbare Aminosäuren wie Tyrosin und Histidin besitzen. Die direkte Jodierung von kleinen Molekülen, wie Alkaloide, Steroide usw. ist kaum möglich. Selbst wenn das Molekül jodierbare phenolische OH Gruppen besitzt, wird es auf Grund der Größe der Jodatome so verändert, daß es seine Immunreaktivität verliert (Hunter et al., 1975). Einen Ausweg bietet die Kopplung einer jodierbaren Substanz an das Antigen. Die Bindung muß über die funktionelle Gruppe des Antigens erreicht werden, die schon für die Kopplung an das BSA benutzt wurde, da Antikörper Veränderungen in der Nähe der Kopplungsstelle zum Carrier-Protein nicht erkennen. Auf diese Weise kann ein Verlust der Immunreaktivität vermieden werden.

Digitoxin war das erste Molekül, das über ein Tyrosinmethylesterderivat ^{125}J markiert wurde (Oliver et al., 1968).

Weitere für eine Kopplung und Markierung geeignete Substanzen sind Tyrosin (Diel et al., 1977), Histamin (Nars et al., 1973), Tyramin, Tyrosinmethylester (Sors et al., 1977), N-succinimidyl-3-(4-hydroxy-3- ^{125}J -phenyl)-propionat (Bolton und Hunter, 1973) u.a.

Lysergsäure mußte ebenfalls an eine Substanz gebunden werden, die jodiert werden konnte. Sie wurde deshalb über die Mannich Reaktion an Tyramin gekoppelt (s. Abb. 27). Die Kopplung an die jodierbare Substanz wurde also über die funktionelle Gruppe erreicht, die auch zur Bindung an das BSA benutzt wurde.

Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

Lösung A: 9,8 mg (0,072 mmol) Tyramin und ca. 2 μCi ^{14}C Tyraminhydrochlorid wurden in 0,5 ml H_2O und 3 M Natriumazetatlösung gelöst. Dazu wurde tropfenweise im Zeitraum von drei Minuten unter Rühren bei Zimmertemperatur 0,3 ml 37% Formaldehydlösung gegeben. Anschließend wurde der Ansatz weitere zehn Minuten gerührt.

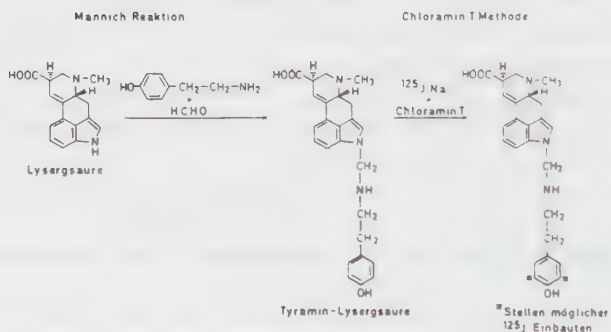


Abb. 27: Syntheseweg von ^{125}J -Tyramin-Lysergsäure

Lösung B: 9,6 mg (0,036 mmol) Lysergsäure wurden in 4 ml H_2O gelöst. Lösung B wurde tropfenförmig ebenfalls im Abstand von drei Minuten zu Lösung A pipettiert. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt.

Anschließend wurde ein Aliquot der Reaktionslösung sowie Lysergsäure und Tyramin als Vergleichssubstanzen im Laufmittel n-Butanol:Eisessig: H_2O = 40:10:50 auf einer Kieselgeldünnschichtplatte (0,25 mm) entwickelt. Auf dem Chromatogramm zeigten sich 4 Hauptbanden mit den R.F. Werten 0,28 (Bande 1), 0,34 (Bande 2), 0,40 (Bande 3) und 0,48 (Bande 4). Die Vergleichssubstanzen hatten die R.F. Werte 0,48 (Tyramin) und 0,40 (Lysergsäure). Zur Identifizierung der ^{14}C Tyramin-Lysergsäurebande wurden die Fluoreszenz der Lysergsäure im langwelligen UV-Bereich und die Radioaktivität des ^{14}C Tyramins herangezogen. Da nur die Bande 1 sowohl Fluoreszenz als auch Radioaktivität zeigte, konnte nur sie das ^{14}C Tyramin-Lysergsäurederivat enthalten.

Um eine größere Menge des Derivates zu isolieren, wurde die gesamte Ansatzlösung bandförmig auf eine Kieselgeldickschichtplatte (1 mm) aufgetragen und im oben beschriebenen Laufmittel entwickelt. Die Tyramin-Lysergsäure Bande wurde isoliert und das Derivat mit Methanol eluiert. Ein aliquoter Teil der Elutionslösung wurde in drei anderen Laufmitteln chromatographiert. Es zeigte sich, daß die Substanz relativ sauber war. Eine schwächere Nebenbande, die in allen Chromatogrammen auftrat, ließ sich auch durch wiederholte Chromatographie nicht beseitigen und muß als Zersetzungsprodukt von Tyramin-Lysergsäure angesehen werden.

Die Ausbeute an Tyramin-Lysergsäure wurde quantitativ fluorimetrisch bei der Wellenlänge 313 nm mit dem Zeiss Spektralphotometer bestimmt (s. Methoden). Dabei wurde angenommen, daß sich die Fluoreszenz der Lysergsäure im Derivat nicht von der freien Säure unterscheidet. Die Ausbeute betrug 0,56 mg Tyramin-Lysergsäure.

Für eine Jodmarkierung von Proteinen und geeigneten Hapten-derivaten sind in der Literatur mehrere Methoden beschrieben worden. Einige der wichtigsten sind die enzymatisch katalysierte Jodierung mit Lactoperoxidase (Marchalonis et al., 1969, Marshall et al., 1975), die Methode von Bolton und Hunter (1973), bei der ein bereits jodiertes Derivat ans Hapten gekoppelt wird, und die Chloramin T Methode (Greenwood et al., 1963). Die Chloramin T Reaktion ist die am häufigsten benutzte Methode für eine Jodierung, da sie einfach durchzuführen ist und zu hoch markierten Tracern führt. Tyramin-Lysergsäure wurde nach dieser Methode markiert.

Chloramin-T gibt in wässriger Lösung Chlor ab, aus dem sich die oxidierend wirkende hypochlorige Säure bildet. In Anwesenheit von negativ geladenen Jodionen bildet sich als Zwischenprodukt JCl , aus dem das positiv geladene Jodion z.B. mit p-Hydroxyphenylresten reagiert. Die Reaktionszeit muß kurz sein, da sonst das Antigen zerstört werden kann. Die Reaktion kann durch Natriummetabisulfit ($Na_2S_2O_5$), das das aktive J^+ zum inakten J^- reduziert, gestoppt werden.

Die Chloramin T Methode wurde nach dem von Weiler (1976) entwickelten Verfahren in durch Gummidichtungen verschlossenen konischen Reaktionsgefäßen im μl Maßstab durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit einer Glasspritze (50 μl und 100 μl) durch das Septum in das Reaktionsgefäß injiziert bzw. entnommen, so daß die Kontaminationsgefahr auf ein Minimum beschränkt war.

Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

Zu 0,46 mmol trägerfreiem $Na^{125}J$ (sp.Akt. 2160 Ci/mmol) wurden 0,92 mmol (0,35 μg) Tyramin-Lysergsäure, die in 100 μl 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst waren, pipettiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 3,5 mmol (1 μg) Chloramin T in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,5 gestartet und nach 45 s durch Zugabe von 3,5 mmol (0,67 μg) $Na_2S_2O_5$ gestoppt, anschließend wurde mit 1 x 100 μl und 1 x 50 μl Chloroform extrahiert.

Die vereinigten Chloroformphasen wurden auf eine Kieselgel-dünnschichtplatte als zwei cm lange Bande aufgetragen und im Laufmittel n-Butanol:Eisessig:H₂O = 40:10:50 entwickelt. Nach dem Trocknen wurde die Platte zur Verminderung der Kontaminationsgefahr in eine Plastikfolie eingeschweißt und die Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm mit einem Dünnschichtscanner bestimmt.

Auf Grund der Verteilung konnten radioaktive Substanzen mit den RF-Werten 0,20 (Bande 1), 0,45 (Bande 2) und 0,83 (Bande 3) ermittelt werden. Die drei entsprechenden Banden auf dem Chromatogramm wurden ausgeschnitten und getrennt 1 Stunde bei Zimmertemperatur in Methanol eluiert. Anschließend wurden die drei Eluate auf ihre Immunreaktivität gegen spezifische Lysergsäureantikörper getestet. Nur die Substanzen aus der Elutionslösung der Bande 1 waren immunreaktiv. Eine 1:500 verdünnte Lösung des spezifischen Lysergsäureantiserums band 25% der eingesetzten Radioaktivität, bei Antikörperüberschuß wurden 35% gebunden. Eine höhere Bindungsrate ließ sich auch durch nochmalige Reinigung des Eluates in zwei verschiedenen Laufmitteln nicht erreichen.

Die geringe Immunreaktivität des ¹²⁵J Tracers beeinflusste die Eigenschaften des Lysergsäure RIA's jedoch nicht negativ, wie der Vergleich mit dem entsprechenden Test mit ³H markiertem Antigen (Immunreaktivität 75%) in den Kapiteln 5.3, 5.5 und 5.6 zeigte.

Da die Substanzmenge des jodierten Derivates sehr gering war, konnte die spezifische Aktivität nicht direkt bestimmt werden. Auch eine Bestimmung über die Self-Displacement Methode schied aus, weil der Antikörper das unmarkierte Antigen und seine jodierte Form immunologisch unterscheiden konnte. Deshalb konnte die spezifische Aktivität des ¹²⁵J Tracers nur geschätzt werden. Nimmt man an, daß die unmarkierte Tyramin-Lysergsäure quantitativ eluiert wurde, so dürfte die spezifische Aktivität bei einer Einbaurate von ca. 50% der gemessenen Gesamt-

radioaktivität in das Tyramin-Lysergsäurederivat zwischen 300 und 500 Ci/mmol liegen.

5.2 Herstellung der Lysergsäure Immunogene

Lysergsäure wurde über zwei verschiedene Molekülstellen an Bovinserumalbumin gekoppelt, wie Abb. 28 zeigt.

- 1) über die NH-Gruppe mit Hilfe der Mannich Reaktion
- 2) über die COOH Gruppe mit Hilfe der gemischten Anhydrid Reaktion

- 1) Die Synthese über die Mannich Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Lösung A: 50 mg (0,00071 mmol) BSA wurden in 1 ml H_2O und 2 ml 3M Natriumazetatlösung gelöst. Dazu wurde unter Rühren bei Zimmertemperatur 1 ml 37% Formaldehydlösung tropfenweise innerhalb von drei Minuten gegeben. Der Ansatz wurde weitere zehn Minuten gerührt.

Lösung B: 19 mg (0,071 mmol) Lysergsäure und ca. 1,3 μCi 3H Lysergsäure wurden in fünf ml H_2O gelöst.

Lösung B wurde tropfenweise innerhalb von fünf Minuten zu Lösung A pipettiert. Der Ansatz wurde drei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, anschließend bei 4°C zwei Tage gegen fließendes Leitungswasser und zwei Tage gegen destilliertes H_2O dialysiert und dann gefriergetrocknet.

Die Ausbeute betrug 31 mg Lysergsäure-BSA Konjugat. Das in Puffer gelöste Konjugat wurde im Laufmittel Propanol: H_2O = 70:30 entwickelt. Es zeigte sich, daß keine freie Lysergsäure in der Lösung vorhanden war. Das Kopplungsprodukt fluoreszierte im langwelligen U.V. Licht, wie Lysergsäure, stark blau. Die Radioaktivität des Kopplungsproduktes wurde bestimmt und daraus die Kopplungsrate von 8,6 berechnet.

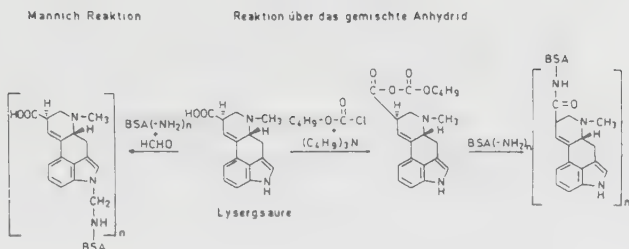


Abb. 28: Syntheseweg der Lysergsäureimmunogene

2) Synthese über die gemischte Anhydrid Reaktion

Die gemischte Anhydrid Reaktion wurde 1957 zum erstenmal von Erlanger für die Kopplung von Testosteron-3-(Carboxymethyl) oxim an Bovinserumalbumin eingesetzt. Die Reaktion wird in zwei Schritten durchgeführt.

Im ersten Schritt wird das gemischte Anhydrid aus dem Hapten, das eine freie Carboxylgruppe besitzen muß, und Chlorkohlensäureestern in Gegenwart tertiärer Basen gebildet. Die Reaktion muß in wasserfreiem Medium ausgeführt werden, da das gemischte Anhydrid in Gegenwart von H_2O zerfällt. Im zweiten Schritt reagieren die $\epsilon-NH_2$ -Gruppen des BSA unter Auflösung des Anhydrids und Bildung einer Peptidbindung mit dem Antigen. Da BSA nicht in wasserfreien Lösungsmitteln gelöst werden kann, müssen die Lösungsmittel aus Schritt 1 mit Wasser mischbar sein. Die Reaktionen müssen bei niedrigen Temperaturen ausgeführt werden, weil das gemischte Anhydrid nur dann stabil ist.

Die Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

Lösung A: 38,3 mg (0,143 mmol) Lysergsäure und ca. 1,6 μCi ^3H Lysergsäure und 34,9 μl (0,143 mmol) Tributylamin wurden in 5 ml Dioxan gelöst. Unter Rühren bei 4°C wurden tropfenweise im Zeitraum von 4 Minuten 18,75 μl (0,143 mmol) Chlorameisensäure-isobutylester zur eisgekühlten Lösung gegeben.

Lösung B: 100 mg (0,00143 mmol) BSA wurden in 5 ml 50% wässrigem Dioxan gelöst. Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 9 eingestellt.

Nach zehn Minuten wurde Lösung B auf einmal zu Lösung A pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde dann vier Stunden bei 4°C gerührt, wobei der pH-Wert alle 30 Minuten auf pH 9 eingestellt wurde. Anschließend wurde die Lösung 2 Tage gegen H_2O : Dioxan = 1:1 und 2 Tage gegen destilliertes H_2O dialysiert und dann gefriergetrocknet.

Die Ausbeute an Lysergsäure-BSA Konjugat betrug 75,5 mg. Die Radioaktivität des Konjugates wurde bestimmt und daraus eine Kopplungsrate von 5,8 errechnet. Das gelöste Konjugat wurde im oben beschriebenen Laufmittel entwickelt. Es zeigte sich, daß keine freie Lysergsäure mehr im Reaktionsansatz vorhanden war. Das Kopplungsprodukt fluoreszierte im langwelligeren U.V. Licht intensiv blau.

Mit den beiden Konjugaten wurden mit der im Methodenteil beschriebenen Immunisierungstechnik Antikörper gewonnen.

5.3 Wahl geeigneter Testbedingungen zur radioimmunologischen Bestimmung von Lysergsäure und einfachen Lysergsäurederivaten wie Ergometrin

Die Reaktionen der spezifischen Lysergsäureantikörper (Immuno-bildung über Mannich Reaktion) mit Lysergsäure und der

polyspezifischen Lysergsäureantikörper (Immunogenbildung über die gemischte Anhydrid Reaktion) mit Lysergsäure oder Ergometrin liefen unter den gleichen Testbedingungen optimal ab. Auch die Fällungsbedingungen waren identisch. Die Ergebnisse sind zu erwarten gewesen, da die benutzten Antigene identisch bzw. strukturell sehr ähnlich sind.

Überraschend war dagegen, daß die optimalen Testbedingungen für die Lysergsäure Radioimmuntests mit den bereits früher ermittelten optimalen Testbedingungen für die Peptidalkaloid RIA's übereinstimmten.

Die im Kapitel 4.2 angegebenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Rinderserumkonzentrationen, Inkubationszeiten und -temperaturen sowie der pH-Wert ermöglichen daher eine optimale Antigen-Antikörperreaktion und Fällung bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Ergotalkaloid RIA's.

5.4 Charakterisierung der Antiseren

Es wurden jeweils 2 Tiere mit den über die Mannich Reaktion und über die gemischte Anhydrid Reaktion gebildeten Immunogenen immunisiert. Die Antikörper, die gegen das erste Immunogen gebildet wurden, waren im Gegensatz zum zweiten sehr spezifisch. (Zur Erklärung siehe Kapitel 5.6). Da bereits die zuerst untersuchten Antiserumfraktionen die gewünschte hohe bzw. niedrige Kreuzreaktion gegen das Lysergsäurederivat Ergometrin mit weniger als 0,2% bzw. 53% aufwiesen, wurden keine weiteren Antiserumfraktionen auf ihre Spezifität getestet.

Für die Bestimmung des Titerverlaufs wurden jeweils acht Antiserumfraktionen untersucht. Die Titermaxima der polyspezifischen Antiserumfraktionen traten jeweils nach der zweiten Boosterinjektion auf und lagen bei 1:65 bzw. 1:30. Die Titer der spezifischen Antiseren waren insgesamt höher.

Die Titermaxima, die in den nach der vierten und fünften Boosterinjektion gewonnenen Antiserum gemessen wurden, hatten den Wert 1:220 bzw. 1:110. Wie in den Kapiteln 2.3 und 4.3 waren die Titerverläufe auch hier wieder abhängig von der Immunisierungszeit und vom Genotyp des Einzeltieres.

Die Empfindlichkeit der mit dem spezifischen und dem polyspezifischen Antiserum aufgestellten Standardkurven war unterschiedlich, obwohl der gleiche Tracer und die gleichen Testbedingungen benutzt wurden. Der Grund lag in der unterschiedlichen Affinität der spezifischen und der polyspezifischen Antikörper zur Lysergsäure. Ein Maß für die Affinität ist die Affinitätskonstante. Sie wurde aus Standardkurven nach Scatchard (1949) berechnet. Das Prinzip kann durch Umwandlung der Gleichung für die im Gleichgewicht befindliche Antigen-Antikörperreaktion veranschaulicht werden.

$$\frac{[Ag \ Ak]}{[Ag][Ak]} = K \quad 2.$$

Zur Vereinfachung wird der Ausdruck $Ag \ Ak$, der für die gebundene Fraktion und damit für das gebundene Antigen steht, durch x ersetzt. Ag gibt die freie Antigenmenge und Ak die freie Antikörpermenge an. Dann gilt:

$$\frac{x}{(Ag - x)(Ak - x)} = K \quad 3.$$

$$\frac{x}{Ag - x} = K (Ak - x) \quad 4.$$

$$\frac{x}{Ag - x} = K Ak - Kx \quad 5.$$

Der Ausdruck $\frac{x}{Ag - x}$ ist äquivalent der $\frac{B}{F}$ Rate

(Quotient aus gebundenem und freiem Antigen), $K Ak$ ist konstant, während Kx variabel ist. Aus dieser Umwandlung ist

ersichtlich, daß die Auftragung der B/F Rate gegen das gebundene Antigen eine Gerade mit der Steigung $-K$ ergibt. Die Konzentration der Antikörper kann ebenfalls durch diese Auftragung bestimmt werden. Sie ist durch den Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse festgelegt. Im Schnittpunkt ist $B/F = 0$. Dadurch ergibt sich aus Gleichung 5:

$$0 = K A_k - K_x$$

$$A_k = x$$

Abb. 29 zeigt die Auftragung nach Scatchard mit Hilfe der Lysergsäure Standardkurvendaten. Es ist ersichtlich, daß die höhere Empfindlichkeit des polyspezifischen Lysergsäure RIA's auf die höhere Affinität der Antikörper zum Antigen zurückzuführen ist.

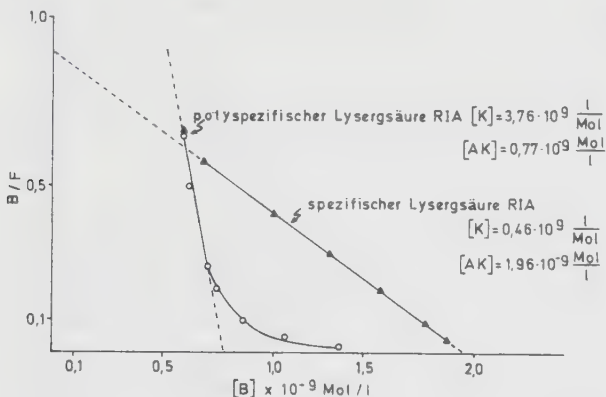


Abb. 29: Auftragung der Standardkurvendaten des spezifischen (●—●—●) und des polyspezifischen (○—○—○) Lysergsäureradioimmunoassays nach Scatchard zur Ermittlung von $[K]$ und $[AK]$.

Die Nichtlinearität der Auftragung der Lysergsäure Standardkurvendaten läßt erkennen, daß das polyspezifische Antiserum aus mehreren Antikörperpopulationen mit unterschiedlichen K Werten besteht. Dagegen scheint das spezifische Antiserum auf Grund der Linearität der Auftragung eine homogene Antikörperpopulation zu besitzen.

5.5 Standardisierung der Tests

Auf Grund der hohen Kreuzreaktion der polyspezifischen Lysergsäureantikörper gegen Ergometrin konnte das Alkaloid mit diesem RIA quantitativ erfaßt werden. Die Quantifizierung erfolgte wie beim Lysergsäure RIA mit einer Standardkurve (Abb. 30a).

Abb. 30b zeigt die mit dem spezifischen Antiserum erstellten Standardkurven unter Benutzung von ^3H und ^{125}J Lysergsäure.

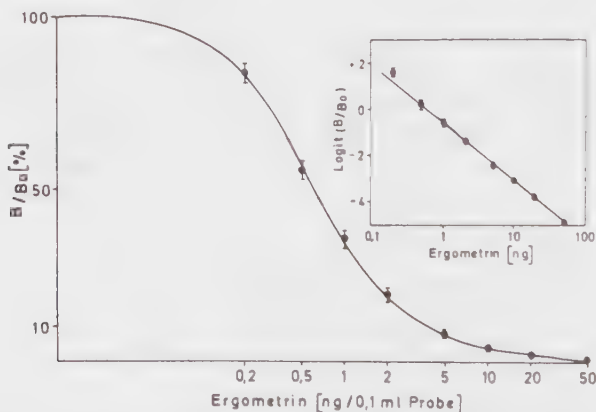


Abb. 30a: Ergometrin-Standardkurve ($n=14$) in zwei möglichen Auftragungen unter Verwendung des polyspezifischen Lysergsäureantiseraums

RIA	markiertes Antigen	benutzter Antikörper	linearer Abschnitt der logit-log Geraden	$B/B_0 = 50\%$	Steigung der logit-log Geraden	U.B.-Werte
Ergometrin	^3H Lyserg- säure	polyspezifisch	0,2 ng - 10 ng	0,62 ng	- 2,6	1%
Lysergsäure	^3H Lyserg- säure	spezifisch	0,3 ng - 30 ng	1,39 ng	- 2,6	1%
Lysergsäure	^{125}I -Ty-Lyserg- säure	spezifisch	0,3 ng - 30 ng	2,10 ng	- 2,6	1%

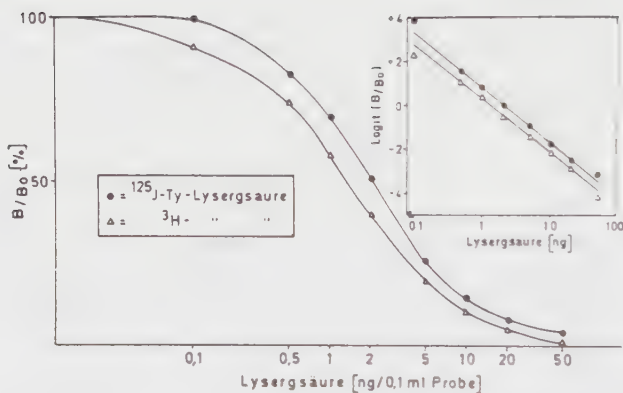


Abb. 30b: Lysergsäure-Standardkurve in zwei möglichen Auftragungen unter Verwendung des spezifischen Lysergsäureantiserums und ^{125}J -Ty-Lysergsäure und ^3H -Lysergsäure

In Tab. 12 sind die für den Verlauf dieser Kurven charakteristischen Parameter angegeben, deren Größen sehr ähnlich und teilweise sogar identisch sind. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der mit den spezifischen und polyspezifischen Antikörpern aufgebauten RIA's ist bereits im vorigen Kapitel mit verschiedenen Affinitäten der beiden Antiseren zur Lysergsäure erklärt worden.

Da die jodierte Lysergsäure eine bedeutend höhere spezifische Aktivität hatte als die tritierte, war die vergleichsweise geringe Sensitivität des Lysergsäure Tests mit ^{125}J Tracer unerwartet. Der Grund liegt wahrscheinlich in den verschiedenen Reaktivitäten des spezifischen Antiserums mit Lysergsäure und Tyramin-Lysergsäure.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die hier aufgeführten Ergotalkaloide RIA's eine Sensitivität erreichen, die von keiner anderen analytischen Methode für die Bestimmung von Ergotalkaloiden übertroffen wird.

5.6 Untersuchung der Spezifität der Tests

Da Antikörper Veränderungen im Kopplungsbereich nicht erkennen (vgl. Kohen et al., 1975), wurde versucht, durch Variation der Kopplungsstelle spezifische und nichtspezifische Lysergsäureantikörper zu erzeugen. Die Antikörper, die gegen das über die C-17 Carboxylgruppe der Lysergsäure hergestellte Immunogen gebildet worden waren, sollten theoretisch hohe Kreuzreaktionen gegen C-17 Derivate (alle einfachen Lysergsäurederivate) aufweisen. Weiterhin wurden hohe Kreuzreaktionen gegen einige strukturell sehr ähnliche Clavine erwartet.

Die gegen das über die NH-Gruppe des Indolringes hergestellte Immunogen gebildeten Antikörper sollten jedoch sehr spezifisch sein, da die strukturellen Unterschiede der anderen Ergotalkaloide gegenüber der Lysergsäure in dem der Kopplungsstelle genau gegenüberliegenden Molekülteil zu finden sind.

5.6.1 Bestimmung der Kreuzreaktionen der Antikörper gegen andere Ergotalkaloide

Zur Bestimmung der Spezifität der Antikörper wurden wieder die Kreuzreaktionen gegen die wichtigsten natürlich vorkommenden Ergotalkaloide und einige synthetisch hergestellte Derivate bestimmt. Die Daten sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Wie erwartet, wiesen die spezifischen Lysergsäureantikörper gegen alle getesteten Alkaloide Kreuzreaktionen auf, die unter 0,2% lagen (Abb. 31a). Die Ergebnisse waren vom benutzten Tracer (^3H oder ^{125}J Lysergsäure) unabhängig. An Hand dieser

Ergebnisse war keine Störung des spezifischen Lysergsäure RIA's durch andere Ergotalkaloide zu befürchten.

Die Kreuzreaktionen der polyspezifischen Antikörper waren gegen alle getesteten einfachen Lysergsäurederivate und die Clavine, die am C-17 andere funktionelle Gruppen hatten (Lysergol, Lysergen, Elymoclavin) sehr hoch (Abb. 31b). Geringfügige zusätzliche Unterschiede am C-8, obwohl in unmittelbarer Nähe der Kopplungsstelle, führten zu einer starken Abnahme der Reaktivität des entsprechenden Clavins mit dem Antikörper. So reagierten die polyspezifischen Antikörper noch sehr gut mit Lysergol (K.R. = 52,6%), einer Substanz, die sich von Lysergsäure durch den Ersatz der C-17 Carboxylgruppe durch eine Methylgruppe unterscheidet. Dagegen verliefen die Reaktionen mit dem C-8 Isomeren Isolysergol (K.R. 5%) und mit Setoclavin (K.R. 0,18%), einer Substanz, bei der das H Atom am C-8 durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist, entschieden schwächer.

Auf Grund der hohen Kreuzreaktionen der polyspezifischen Antikörper gegen die einfachen Lysergsäurederivate und einige Clavine kann der polyspezifische Lysergsäure RIA für die Erfassung aller einfachen Lysergsäurederivate benutzt werden. Für die Praxis wäre ein solcher Test beispielsweise für ein Screening von Pilzkulturen oder Pflanzen verschiedener Arten und Gattungen auf Lysergsäurederivate interessant. Die polyspezifischen Lysergsäureantikörper können aber auch für die Bestimmung einzelner Substanzen benutzt werden, wie im folgenden dargestellt wird.

5.6.2 Bestimmung der Verteilung von immunreaktivem Material auf dem Chromatogramm eines C. purpurea Submerskulturfiltrates

Folgender Versuch wurde durchgeführt, um zu zeigen, daß der polyspezifische Lysergsäure RIA auch zur Einzelbestimmung anderer Ergotalkaloide benutzt werden kann.

Ein aliquoter Teil eines Kulturfiltrats des C. purpurea Stammes 202, das bekannterweise Ergocristin und das einfache Lysergsäurederivat Ergometrin enthielt, wurde auf eine in dreißig ca. 0,5 cm breite Abschnitte eingeteilte Dünnschichtplatte aufgetragen und mit Vergleichssubstanzen im Laufmittel Essigsäureäthylester:Dimethylformamid:Äthanol (96%):NH₃ (25%) = 130:19:1:0.2 entwickelt.

Nach dem Trocknen wurde die Fluoreszenzverteilung auf dem Chromatogramm bei der Anregungswellenlänge 313 nm mit dem Spektralphotometer bestimmt. Dann wurden die dreißig Banden ausgeschnitten, das Kieselgel isoliert und die Substanzen mit je 2 ml Methanol über Nacht bei 4°C eluiert. Die Extrakte wurden anschließend verdünnt und der Gehalt an immunreaktiver Substanz mit dem Ergometrin und dem Ergocristin RIA bestimmt.

Abb. 32 zeigt, daß Ergometrin bzw. Ergocristin und Ergocristinin sehr selektiv erfaßt wurden. Es ist also möglich, beide Substanzen einzeln aus nicht vorgereinigten Kulturfiltraten des Stammes 202 zu bestimmen. Prinzipiell ist die Möglichkeit gegeben, alle Lysergsäurederivate und Clavine, gegen die die polyspezifischen Antikörper hohe Kreuzreaktionen aufweisen, auch einzeln aus Extrakten oder Filtraten zu bestimmen. Es muß dann aber sehr genau untersucht werden, inwieweit die Bestimmung durch andere Alkaloide mit hohen Kreuzreaktionen gestört wird. Kritisch wird der Test nur, wenn diese Substanzen im Extrakt in gleichen oder höheren Konzentrationen vorliegen als die zu testende Substanz selbst.

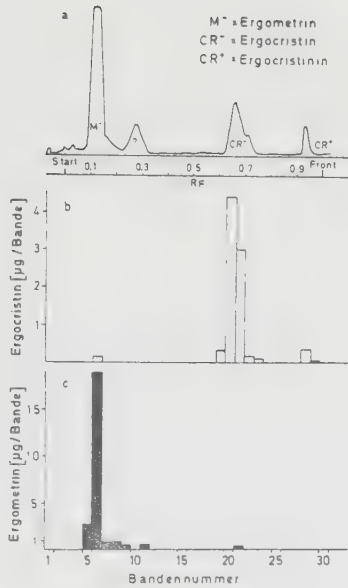


Abb. 32: Dünnschichtchromatogramm des Kulturfiltrats des *C. purpurea* Stammes 202

- a) Fluoreszenzintensitätsortskurve
- b) Verteilung von immunreaktivem Material gemessen mit dem Ergocristin RIA
- c) Verteilung von immunreaktivem Material gemessen mit dem Ergometrin RIA

6. Anwendung der Radioimmuntests für Ergotalkaloide

Die Ergotalkaloide Ergotamin, Ergocristin, Lysergsäure und Ergometrin, zu deren Bestimmung der Aufbau von Radioimmuntests in den vorigen Kapiteln beschrieben worden ist, werden weltweit in großer Menge in der Pharmaindustrie für die Behandlung verschiedener Krankheiten gebraucht (s. Einleitung). Mit Ausnahme von Lysergsäure können sie aus C. purpurea Sklerotien, die durch künstliche Infektion von Roggenfeldern erzeugt werden, oder aus saprophytischen Kulturen von C. purpurea oder C. paspali (nur Ergometrin) gewonnen werden.

Der parasitische Anbau auf Roggen ist sehr arbeits- und kostenintensiv, obwohl er durch Impf- und teilweise durch Erntemaschinen mechanisiert worden ist (Békésy, 1934, Békésy, 1938). Weiterhin ist die Extraktion der temperatur- und lichtempfindlichen Alkaloide sehr aufwendig. Eine Alternative bietet die Gewinnung der Alkaloide aus saprophytischen Submers- oder Oberflächenkulturen. Myzel für die Anlage dieser Kulturen kann relativ leicht von Sklerotien gewonnen werden, und der Pilz wächst in den verschiedensten Medien sehr gut.

Man hat jedoch jahrelang vergeblich versucht, mit diesen saprophytischen Kulturen (von C. purpurea) größere Alkaloidmengen zu gewinnen (vgl. Gröger und Johne, 1978, Mantle, 1975, Floss, 1976). Erst 1961 gelang es Arcamone et al., erstmals einfache Lysergsäurederivate in wirtschaftlich interessanten Größenordnungen in Submerskulturen eines C. paspali Stammes zu erzeugen. Die Produktion eines Peptidalkaloids in größerer Menge in Submerskultur glückte sogar erst 1966 (Tonolo et al.). Bis heute sind von mehreren Arbeitsgruppen viele Patente und Veröffentlichungen herausgebracht worden, in denen Claviceps purpurea und Claviceps paspali Stämme sowie Verfahren beschrieben worden sind, die für eine saprophytische Erzeugung von Ergotalkaloiden in industriellem Maßstab geeignet sind (Kobel et al., 1964, Rutschmann et al., 1965, Chain et al., 1965, Amici et al., 1969, Arcamone et al., 1970).

Die einfachen Lysergsäurederivate, aus denen durch Hydrolyse Lysergsäure gewonnen werden kann, werden hauptsächlich durch Fermentation von C. paspali Stämmen erzeugt. Dagegen gewinnt man heute noch etwa 90% der Peptidalkaloide nach wie vor aus dem Feldanbau (Gröger und Johne, 1978, Floss, 1976), weil die Fermentation von C. purpurea noch nicht kostengünstiger ist. Ein Grund liegt darin, daß die sowieso nicht sonderlich hohen Alkaloidausbeuten (bis zu 1 g/l Medium) wegen der genetischen Labilität der meisten Pilzstämmen im industriellen Maßstab nicht kontinuierlich zu erzielen sind.

In Anbetracht des stetig steigenden Weltbedarfs an Peptidalkaloiden müssen bessere C. purpurea Hochleistungsstämmen sowohl für die parasitische als auch für die saprophytische Alkaloidproduktion selektiert werden. Die aufgestellten Peptidalkaloid RIA's sind auf Grund ihrer Sensitivität und Spezifität, die einen hohen Probendurchsatz erlaubt, hervorragend für ein Screening-Programm auf alkaloidreiche Sklerotien und Myzelkulturen geeignet, was im folgenden erstmals demonstriert wird.

6.1 Selektionsuntersuchungen an verschiedenen C. purpurea Herkünften

Das Ausgangsmaterial für die Selektion von parasitischen und saprophytischen Hochleistungsstämmen waren Sklerotien aus 36 verschiedenen geographischen Herkünften (s. Kapitel II, 1.3). Bevor mit den Selektionsuntersuchungen begonnen werden konnte, mußten eine repräsentative Probenentnahmestelle und eine geeignete Methode für die Extraktion der Alkaloide aus Sklerotien ermittelt werden.

6.1.1 Methode für die Extraktion der Alkaloide aus Sklerotien

Beim Extrahieren der Ergotalkaloide aus dem Mutterkorn oder aus saprophytisch gewonnenem Myzel muß die leichte Zersetzbar-

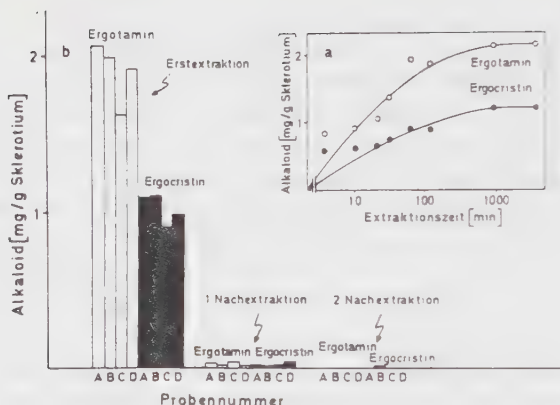


Abb. 33a-b: Extraktion von Ergotamin und Ergocristin aus C. purpurea Sklerotien mit 50% wässriger Acetonlösung, die 2% Weinsäure enthält.

- a) Zeitlicher Verlauf der Alkaloidextraktion bei Raumtemperatur
- b) Überprüfung der Vollständigkeit der Extraktion

keit dieser Substanzen durch Wärme, Licht und oxydative Einflüsse berücksichtigt werden. Deshalb können viele sonst übliche Extraktionsmittel nicht benutzt werden. Für die Extraktion von Ergotalkaloiden wurde aus diesem Grunde 50% wässrige Acetonlösung, die 2% Weinsäure enthielt, benutzt (Hofmann, 1964). Vor der Extraktion wurde das Sklerotiummaterial in einem Stahlzylinder mit einem durch Hammerschlag beschleunigten Stahlstempel zerschlagen.

Um die Abhängigkeit der Extraktion von der Zeit festzustellen, wurden Parallelproben mit dem gleichen Sklerotienmaterial (20 mg), das beide Peptidalkaloide enthielt, verschieden lange in 5 ml 50% wässriger Acetonlösung, die 2% Weinsäure enthielt, extrahiert. Der Alkaloidgehalt der Extrakte wurde dann mit den Radioimmunttests bestimmt. Abb. 33a zeigt, daß die Meßwerte nach

15 Stunden nahezu unverändert bleiben.

Um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurden 4 Parallelproben (A,B,C,D) wiederum mit je 20 mg des gleichen Sklerotienmaterials dreimal je 15 Stunden extrahiert. Abb. 33b zeigt, daß Ergotamin und Ergocristin während einer 15 Stunden langen Extraktionszeit im oben beschriebenen Extraktionsmittel vollständig extrahiert wurden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß Ergocristin und Ergometrin aus dem saprophytisch gewonnenen Myzel des C. purpurea Stammes 202 unter diesen Extraktionsbedingungen ebenfalls quantitativ extrahiert wurden.

6.1.2 Untersuchungen zur Verteilung von Ergotamin und Ergocristin in C. purpurea Sklerotien

Die Verteilung der Peptidalkaloide in C. purpurea Sklerotien wurde bestimmt, um eine repräsentative Probenentnahmestelle auswählen zu können.

Zur Bestimmung der Längsverteilung der Alkaloide wurde ein Ergotamin enthaltendes Sklerotium der Herkunft Indien II sowie ein Ergocristin enthaltendes Sklerotium der Herkunft U.K.I mit Hilfe einer Rasierklinge in 0,1 mm breite Scheiben zerteilt. Je eine Scheibe aus der Mitte der Sklerotien wurde in Teilstücke zerschnitten, um die Querverteilung der Alkaloide zu ermitteln. Die Proben wurden zerschlagen und 15 Stunden lang bei Zimmertemperatur im oben beschriebenen Extraktionsmittel extrahiert. Die Extrakte wurden verdünnt, und der Alkaloidgehalt mit den RIA's bestimmt. Je ein Stück der Sklerotien (s. Abb. 34a,b) war schon vorher analysiert worden, um die notwendige Verdünnungsstufe zu ermitteln.

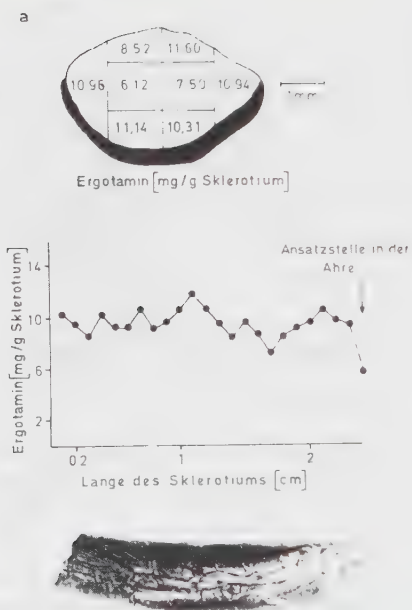


Abb. 34a: Längs- und Querverteilung von Ergotamin in einem Sklerotium aus der Herkunft Indien II

Die Abb. 34a,b zeigen, daß die Alkaloidverteilung innerhalb der Sklerotien recht homogen war. Lediglich das Sklerotiumende, das ursprünglich mit der Ähre in Verbindung stand, wies einen niedrigeren Alkaloidgehalt auf. Die Querverteilung

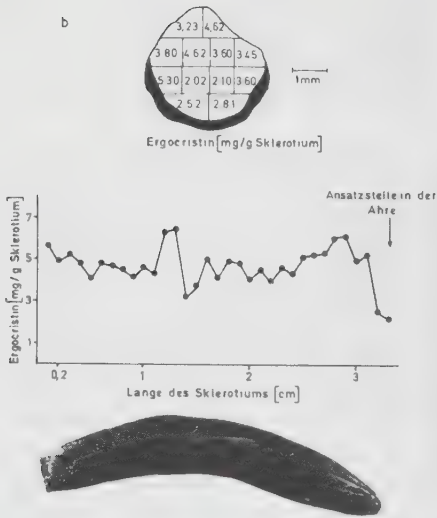


Abb. 34b: Längs- und Querverteilung von Ergocristin in einem Sclerotium der Herkunft U.K.I

der Alkaloide war nicht ganz so homogen wie die Längsverteilung. Sie läßt aber keine systematische Zu- oder Abnahme des Alkaloidgehaltes erkennen. Auf Grund der relativ gleichmäßigen Alkaloidverteilung wurde als repräsentative Probe jeweils ein ca. 20 mg schweres Stück vom ursprünglich freien Ende des Sclerotiums abgeschnitten.

6.1.3 Untersuchung des Alkaloidgehaltes von Sklerotien verschiedener Herkünfte

Nachdem eine repräsentative Probenentnahmestelle bestimmt und eine geeignete Extraktionsmethode gefunden war, konnten mit Hilfe der Radioimmuntests Selektionsuntersuchungen an Sklerotien aus den 36 Herkünften durchgeführt werden.

Abb. 35 zeigt das benutzte Selektionsmodell. Die vom Sklerotium gewonnene repräsentative Probe wurde mit den RIA's untersucht. Falls die Bestimmung einen überdurchschnittlich hohen Alkaloidgehalt ergeben hatte, wurde ein weiteres Stück des Sklerotiums auf Agarmedium aufgelegt (s. Methoden). Der Rest des Sklerotiums wurde aufbewahrt und konnte gegebenenfalls zur weiteren Myzelgewinnung benutzt werden. Mit Hilfe des Myzels der Festkulturen konnten Submerskulturen in für die Alkaloidproduktion geeigneten Produktionsmedien angelegt werden. Sporenabschwemmungen der gleichen Festkulturen wurden als Impfmateriale für parasitische Mutterkornkulturen benutzt (s. Methoden). Durch die Analyse der auf diese Weise gewonnenen Sklerotien und Submerskulturen konnte überprüft werden, ob es gelungen war, aus dem zur Verfügung stehenden Sklerotienmaterial parasitische oder saprophytische Hochleistungsstämme zu selektieren.

Wie Abb. 36 zeigt, unterscheiden sich die getesteten Sklerotien sehr stark bezüglich ihres Ergotamin- und Ergocristingehaltes. Sie konnten auf Grund ihres Alkaloidgehaltes in vier verschiedene chemische Rassen unterteilt werden, nämlich in eine die beide Alkaloide enthält, in eine die beide Alkaloide nicht besitzt und in die beiden Rassen, die jeweils nur eine der getesteten Substanzen enthalten (Tab. 13).

Sklerotien aus 36 verschiedenen Herkunftten

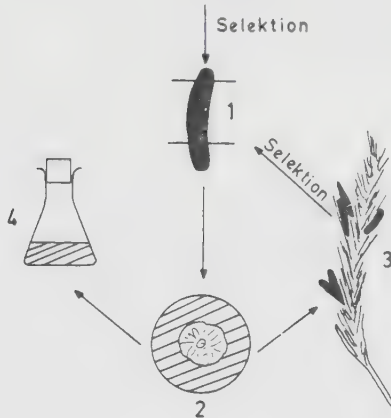


Abb. 35: Schema für die Selektion von parasitischen und saprophytischen C. purpurea Hochleistungsstämmen.

- 1 = Sklerotium
- 2 = Vom Sklerotium gewonnenes Myzel
- 3 = Mit Mutterkorn infizierte Roggenähre
- 4 = C. purpurea Flüssigkultur

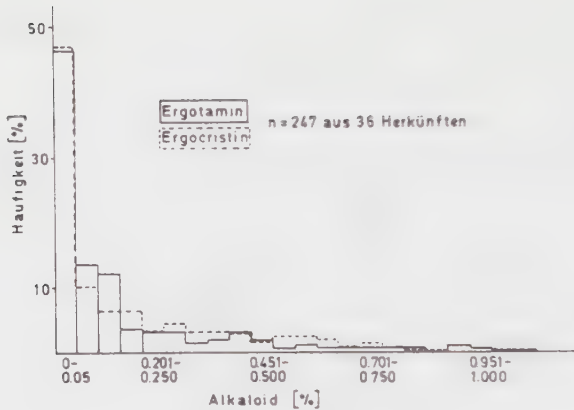


Abb. 36: Häufigkeitsverteilung für den Ergotamin- und Ergocristingehalt von Sklerotien aus 36 verschiedenen Herkunftfen.

Alkaloid	Anzahl der Herkünfte n = 1 - 10	Anzahl der Herkünfte n = 10	Anzahl der Herkünfte, deren Sklerotien nur ei- ner chemischen Ras- se angehören n = 10
----	12	3	3
Ergotamin	5	5	1
Ergocristin	4	4	2
Ergotamin + Ergocristin	15	9	4

n = Anzahl der untersuchten Sklerotien

Tab. 13: Überblick über den Ergotamin- und Ergocristingehalt der 36 verschiedenen Herkunftfen.

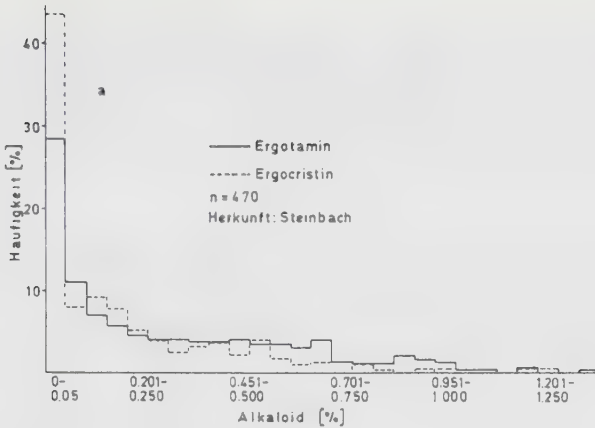


Abb. 37a: Häufigkeitsverteilungen für den Ergotamin- und Ergocristingehalt einer *C. purpurea* Wildpopulation, gesammelt von einem etwa 1 ha großen Roggenfeld in der Nähe von Steinbach/Odenwald.

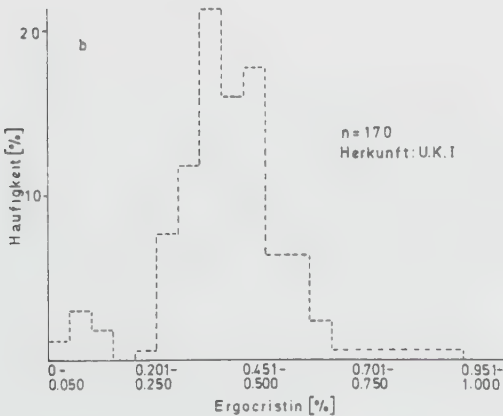


Abb. 37b: Häufigkeitsverteilung für den Ergocristingehalt von Sklerotien aus der Herkunft U.K. I. Auf Grund der relativ einheitlichen Alkaloidverteilung wird vermutet, daß diese Herkunft bereits züchterisch bearbeitet wurde.

Die Sklerotien einer Herkunft konnten einer, zwei, drei und sogar allen vier chemischen Rassen (s. Abb. 37a) angehören. Ein einheitliches Alkaloidspektrum (Abb. 37b) deutete darauf hin, daß diese Herkünfte bereits züchterisch bearbeitet und für kommerzielle Zwecke angebaut worden waren.

Gemäß dem Selektionsschema (Abb. 35) wurden von den Sklerotien mit den höchsten Ergotamin- und Ergocristingehalten Teilstücke auf Agarmedien aufgelegt und mit dem gebildeten Myzel saprophytische und parasitische Mutterkornkulturen angelegt.

Es wurden insgesamt ca. 100 C. purpurea Stämme in mindestens drei (M, N, K) der in Kapitel 6.4.3 aufgeführten Produktionsmedien kultiviert. Zur Anzucht siehe Methodenteil. Keiner dieser saprophytischen Wildstämme produzierte jedoch mehr als 0,5 mg Alkaloid pro Liter Medium.

6.2 Selektionsuntersuchungen an kultivierten C. purpurea Stämmen

Nur eine Analyse des Alkaloidgehaltes der Sklerotien der 1. Nachkommengeneration kann zeigen, ob ein hoher bzw. niedriger Alkaloidgehalt der selektierten Sklerotien genetisch bedingt oder aber auf Modifikationen zurückzuführen war. Als Ursache für eine Modifikation des Peptidalkaloidgehaltes kommen bei den benutzten Sklerotien in Frage: 1. unterschiedliche Witterungs- und Anzuchtbedingungen, 2. Anzahl und Lage der Sklerotien in der Ähre, 3. die Wirtspflanze und 4. der Erntetermin. Um den Einfluß dieser Faktoren auf den Alkaloidgehalt auszuschließen, wurden alle Sklerotien auf Roggenpflanzen der gleichen Sorte, die unter absolut gleichen Anzuchtbedingungen angezogen wurden, kultiviert (s. Methodenteil). Die Infektionstechnik wurde optimiert und die Abhängigkeit von der Wirtspflanze getestet. Weiterhin wurde die Kinetik der Alkaloidbildung und des Wachstums hinsichtlich eines geeigneten Ernte-

zeitpunktes verfolgt. Alle in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurden mit dem C. purpurea Stamm 1065 der Herkunft Indien II durchgeführt. Die für die Infektion benutzten Sporensuspensionen hatten eine Konzentration von 5000 Sporen pro μ l Lösung.

6.2.1 Kinetik der Ergotaminbildung in C. purpurea Sklerotien

Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Ergotaminbildung und des Wachstums von C. purpurea Sklerotien wurden je zehn Blüten von etwa 200 Roggenähren infiziert. Die Anzucht erfolgte im Freiland.

Zu den in Tab. 14 angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils zehn der sich entwickelnden Sklerotien von verschiedenen Ähren geerntet. Der Ergotamingehalt der Sklerotien wurde mit dem RIA bestimmt.

Abb. 38 zeigt die Kinetik des absoluten und des prozentualen Ergotamingehaltes der Sklerotien des Stammes 1065 unter Verwendung der Durchschnittswerte, da die Sklerotien, die zur gleichen Zeit geerntet wurden, teilweise große Unterschiede im Alkaloidgehalt aufwiesen. Die Ergotaminbildung begann ca. 13 Tage nach der Infektion und war nach etwa 36 Tagen ebenso wie das Wachstum der Sklerotien abgeschlossen. Die weitere Steigerung des prozentualen Ergotamingehaltes war auf den eintretenden Wasserverlust der Sklerotien zurückzuführen.

Die Honigtaubildung begann ca. 8 - 10 Tage nach der Infektion, also noch vor der Alkaloidproduktion, die erst nach Abschluß der Honigtaubildung logarithmisch anstieg. Der Beginn der Ergotaminbildung war immer mit einer einsetzenden Pigmentierung des Myzels gekoppelt (Tab. 14).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle kultivierten Sklerotien 6 Wochen nach der Infektion geerntet.

Tage nach der Infek- tion	Anzahl der untersuch- ten Sklero- tien	durch- schnittl. Alkaloidge- halt (mg/g) Sklerotium	Anzahl der alkaloid- haltigen Sklerotien	Anzahl der pigmentierten Sklerotien
9	10	0	0	0
11	10	0	0	0
13	10	0,05	6	6
15	9	0,03	6	6
18	10	0,19	10	10
20	9	0,65	9	9
24	10	1,30	10	10
29	9	3,02	9	9
36	9	4,60	9	9
43	9	4,65	9	9
52	10	6,95	10	10
62	10	7,25	10	10

Tab. 14: Vergleich zwischen Ergotamin- und Pigmentbildung während der parasitischen Entwicklung von Sklerotien des Stammes 1065.

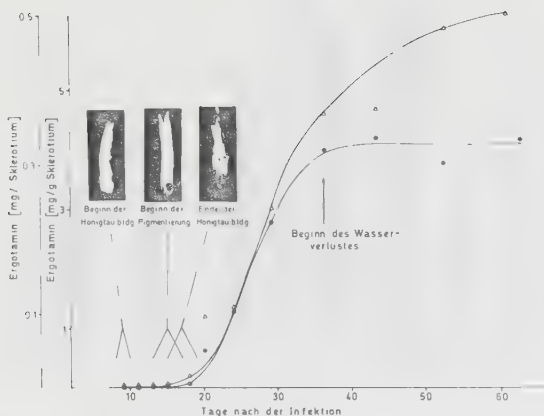


Abb. 38: Kinetik des Wachstums und der Ergotaminbildung in einer parasitischen Mutterkornkultur des Stammes 1065.

6.2.2 Optimierung der Impftechnik

Die Infektionsmethode von Békésy (1938) (s. Methoden) wurde mit dem Ziel optimiert, 1. eine möglichst hohe Alkaloidmenge pro Ähre zu erzeugen und 2. den auf einer Ähre parasitierenden Sklerotien möglichst gleiche Wachstumsbedingungen zu ermöglichen.

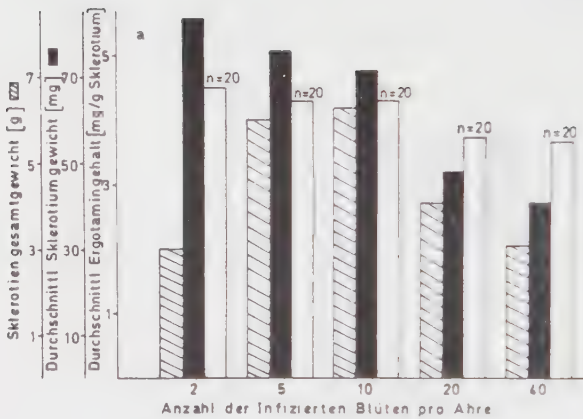


Abb. 39a: Einfluß der Anzahl der Infektionen pro Ähre auf das Wachstum und den Alkaloidgehalt von Sklerotien des Stammes 1065.

Um den Einfluß der Infektionszahl (Anzahl der infizierten Blüten pro Ähre) auf das Wachstum und den Alkaloidgehalt der entstehenden Sklerotien zu testen, wurden unterschiedlich viele Blüten von je 20 Roggenähren infiziert. Die Sklerotien wurden dann nach der Infektionszahl gruppenweise abgeerntet. Aus den Gruppen wurden je 20 repräsentative Sklerotien ausgewählt, die dann mit dem RIA auf ihren Ergotamingehalt untersucht wurden.

Der prozentuale Alkaloidgehalt nahm mit steigender Infektionszahl nur leicht ab, das Gewicht der Sklerotien verringerte sich dagegen sehr stark, was sich auch im Gesamtgewicht der geernteten Sklerotien der einzelnen Gruppen widerspiegelt (Abb. 39a).

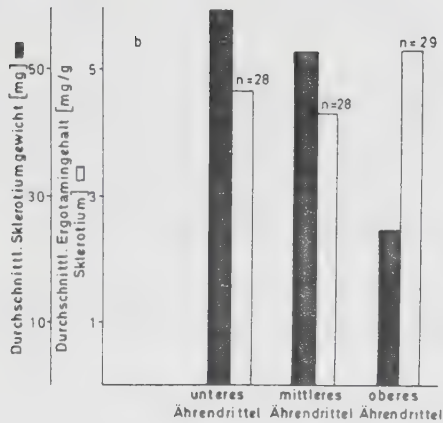


Abb. 39b: Abhängigkeit des Wachstums und des Ergotamingehaltes der Sklerotien des Stammes 1065 von der Lage der Infektionen in der Ähre.

Es muß in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß sich bei höheren Infektionszahlen als 5 nicht in allen infizierten Blüten ein Sklerotium entwickelte. Bei 40 Infektionen pro Ähre reiften höchstens 12 Mutterkörner heran.

In einem zweiten Experiment wurde untersucht, welche Blüten der Roggenähre sich am besten für eine Infektion eigneten. Zu diesem Zweck wurden Sklerotien aus dem oberen, mittleren und unteren Ährendrittel von 30 Roggenähren getrennt geerntet. Aus den drei Gruppen wurden je 28 bzw. 29 repräsentative Sklerotien ausgewählt, deren Ergotamingehalt mit dem Radioimmuntest bestimmt wurde.

Abb. 39b zeigt, daß der prozentuale Ergotamingehalt von der Lage der Sklerotien in der Ähre relativ unabhängig war. Dagegen hatten die Sklerotien aus dem oberen Drittel ein deutlich niedrigeres Einzelgewicht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß die Anzahl und Lage der Infektionen nur geringe Auswirkungen auf den prozentualen Alkaloidgehalt haben. Dagegen ist ein sehr starker Einfluß auf das Wachstum und damit auf das Gewicht der Sklerotien festzustellen. Beim gewerbsmäßigen Anbau von C. purpurea zur Sklerotienengewinnung kann mit dieser optimierten Infektionstechnik das Ernteergebnis an Sklerotien pro ha Roggen (und damit die Alkaloidausbeute) gegenüber einer nicht systematischen Infektion beträchtlich gesteigert werden.

Bei den folgenden Versuchen wurden auf Grund dieser Resultate jeweils fünf Blüten im unteren Ährendrittel infiziert.

6.2.3 Abhängigkeit des Alkaloidgehaltes von der Wirtspflanze

Es ist bekannt, daß die auf verschiedenen Grasarten und Roggen angezogenen Sklerotien des gleichen Stammes sich nicht nur in ihrem Gewicht, sondern auch hinsichtlich ihres prozentualen Alkaloidgehaltes unterscheiden (Békésy, 1956). Im folgenden wurde getestet, ob einzelne Roggenpflanzen der gleichen Sorte den Alkaloidgehalt der in ihren Ähren parasitierenden Sklerotien beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden Sklerotien von 10 Roggenpflanzen getrennt geerntet und mit dem Ergotamin RIA analysiert.

Wie Tabelle 15 zeigt, wichen die durchschnittlichen prozentualen Ergotamingehalte der Sklerotien verschiedener Roggenpflanzen nicht sehr stark voneinander ab. Dagegen waren die Unterschiede zwischen den Alkaloidgehalten der Sklerotien einer einzelnen Ähre sehr groß.

Eine Interpretation ist schwierig, da die Sklerotien einer Ähre identischen Außeneinflüssen unterliegen und auch die gleichen Nährstoffe zu ihrer Entwicklung heranziehen können. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Anzahl und der Genotyp der Sporen, die auf dem Fruchtknoten auskeimen und deren Hyphen das Sklerotium bilden, die Alkaloidbildung beeinflussen.

Roggenähre Nr.	Anzahl der untersuchten Sklerotien	Ergotamingehalt (mg/g Sklerotium)		
		durchschnittl.	höchster	niedrigster
1	11	7,6 ± 1,7	10,8	5,1
2	10	6,4 ± 3,3	10,1	1,5
3	5	8,4 ± 3,3	13,0	1,1
4	10	7,2 ± 2,2	10,7	3,2
5	9	5,7 ± 1,4	8,1	4,0
6	12	6,1 ± 1,9	9,5	3,1
7	6	5,4 ± 2,0	7,7	3,0
8	4	5,6 ± 2,4	6,5	3,2
9	5	5,3 ± 1,9	6,8	3,0
		6,4 ± 1,1		

Tab. 15: Untersuchung der Abhängigkeit des Ergotamingehaltes der Sklerotien des Stammes 1065 von der Roggenpflanze.

6.2.4 Ergebnisse der Selektionsuntersuchungen an kultivierten Sklerotien

Es wurden von jeder Nachkommengeneration der selektierten Sklerotien mindestens 65 Sklerotien analysiert, um für den Stamm reproduzierbare und repräsentative Alkaloidverteilungskurven zu erhalten. Verteilungskurven verschiedener Stämme konnten auf Grund der gleichmäßigen Wachstumsbedingungen der Sklerotien direkt miteinander verglichen werden.

Um die Genauigkeit der Selektionstechnik zu demonstrieren, wurden Sklerotien der 1. Nachkommengenerationen der Mutter-sklerotien 1595 und 114, in denen keine Peptidalkaloide nach-

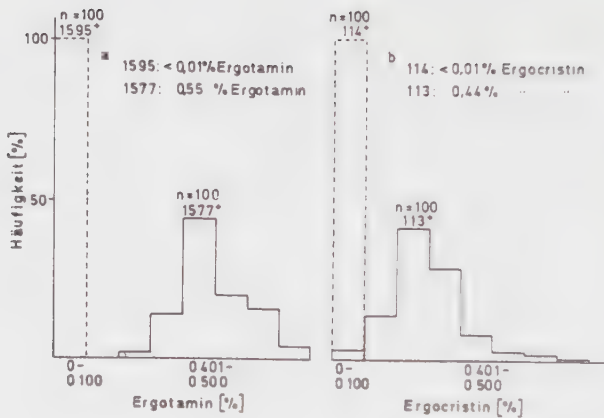


Abb. 40a-b: Häufigkeitsverteilungen für den Alkaloidgehalt der 1. Nachkommengenerationen von alkaloidlosen und alkaloidhaltigen Sklerotien
a) aus der Herkunft Frankreich (Ergotamin)
b) aus der Herkunft Altenschneeberg (Ergocristin)
+ 1. Nachkommengeneration

gewiesen werden konnten, und der alkaloidreichen Muttersklerotien 1577 und 113 mit Hilfe der Radioimmuntests analysiert. Die Sklerotien 113 und 114 stammten ebenso wie die Sklerotien 1577 und 1595 aus einer Herkunft und wurden jeweils auf einem Feld gesammelt.

Abb. 40 zeigt, daß in allen getesteten Sklerotien der Stämme 1595 und 114 keine Peptidalkaloide nachgewiesen werden konnten. Dagegen enthielten die Sklerotien der Stämme 1577 und 113 Ergotamin bzw. Ergocristin in einer durchschnittlichen Menge, die ungefähr mit der der Ausgangssklerotien verglichen werden konnte. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit zur Produktion eines bestimmten Alkaloids vererbt

wird und daß es möglich ist, mit Hilfe der angewandten Selektionsmethode C. purpurea Stämme mit hoher Alkaloidproduktion aus Sklerotienmaterial mit unbekanntem Gehalt zu selektieren.

Die höchsten prozentualen Ergotamingehalte und dazu noch das größte Gewicht von allen untersuchten Sklerotien hatten einige aus der Herkunft Indien II, die wahrscheinlich ebenfalls schon züchterisch bearbeitet worden waren. Abb. 41a zeigt die Häufigkeitsverteilung für den Alkaloidgehalt dieser Sklerotien. In allen konnte Ergotamin festgestellt werden, aber es ließen sich große Unterschiede im prozentualen Gehalt erkennen. Um zu prüfen, ob diese unterschiedlichen Alkaloidgehalte modifikatorisch oder genetisch bedingt waren, wurden Sklerotien der 1. Nachkommengenerationen der Muttersklerotien 1072 (0.47% Ergotamin) und 1065 (2.90% Ergotamin) angezogen und mit dem RIA analysiert.

Der durchschnittliche Alkaloidgehalt des Stammes 1065 lag nur noch um ca. 20% höher als der vom Stamm 1072 (Abb. 41b).

ELTERN SKLEROTIEN				1. NACHKOMMENGENERATION			
Nr.	Herkunft	Sklerotienge- wicht (mg)	Ergotamin (%/g Skl.)	Anzahl der untersuch- ten Sklero- tien	Anzucht der Sklero- tien	Ernteer- gebnis an Sklerotien (g)	
1065	Indien II	280	2,90	0,63	135	Freiland	18,56
1072	Indien II	240	0,47	0,53	121	"	9,34
1863	1065	210	1,13	0,46	85	Klimakammer	11,55
1775	"	200	0,22	0,44	85	"	9,35

Tab. 16: Ergebnisse der Auslesezüchtung aus der Herkunft
Indien II.

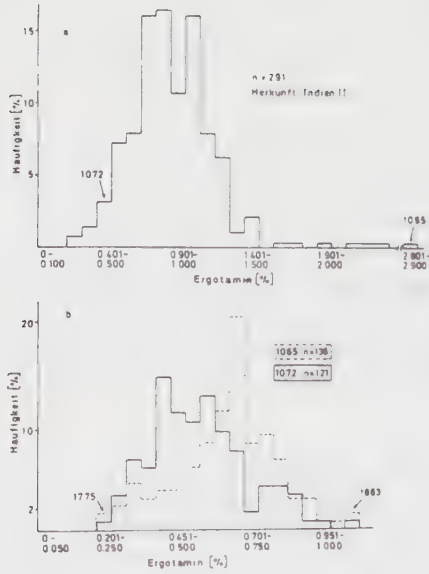


Abb. 41a: Häufigkeitsverteilung für den Ergotamingehalt von Sklerotien der Herkunft Indien II.

Abb. 41b: Häufigkeitsverteilungen der ersten Nachkommengenerationen der aus der Herkunft Indien II selektierten Sklerotien Nr. 1065 und Nr. 1072.

Die hohen bzw. niedrigen Alkaloidgehalte der Muttersklerotien 1065 und 1072 müssen also mehr auf modifikatorische als auf genetische Ursachen zurückgeführt werden. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden dann noch die Sklerotien der 1. Nachkommengenerationen der Muttersklerotien 1775 und 1863 (s. Abb. 41b) auf ihren Alkaloidgehalt getestet. Diese Sklerotien hatten den niedrigsten bzw. höchsten Ergotamingehalt der 1. Nachkommengeneration des Stammes 1065.

Aus Tab. 16 ist ersichtlich, daß der durchschnittliche Alkaloidgehalt der beiden Stämme beinahe identisch war. Der unterschiedliche Ergotamingehalt der Sklerotien 1775 und 1863 hatte also nur modifikatorische Ursachen.

Die Ergebnisse zeigen, daß es mit Hilfe der hier beschriebenen Selektionsmethode möglich ist, aus differentem Sklerotienmaterial C. purpurea Stämme mit hohem Alkaloidgehalt zu selektieren. Eine Steigerung der Alkaloidproduktion dieser Hochleistungsstämme durch weitere Selektionszüchtung ist jedoch nur in kleinen Schritten bis zu einem vom jeweiligen Stamm abhängigen maximalen Gehalt möglich.

Es ist in der Literatur mehrfach von der genetischen Inhomogenität eines Sklerotiums bzw. des von einem Sklerotium gewonnenen Myzels berichtet worden (Békésy, 1956, Amici et al., 1967, Mantle, 1974, Esser und Tudzynski, 1978). Diese Inhomogenität wird auf die Anwesenheit genetisch verschiedener Kerne in einem Sklerotium zurückgeführt. Von einem Sklerotium gewonnenes Myzel bildet Konidiosporen und Chlamydosporen, die meistens einkernig und nur selten zweikernig sind (Pazoutova et al., 1978, Jung und Rochelmeyer, 1960) und daher genetisch verschieden sein können. Aus diesem Grunde wurde versucht, mit Hilfe von Einsporenkulturen (s. Methoden) vom Myzel des Sklerotiums 1065 Stämme mit noch höherem Alkaloidgehalt zu erzeugen.

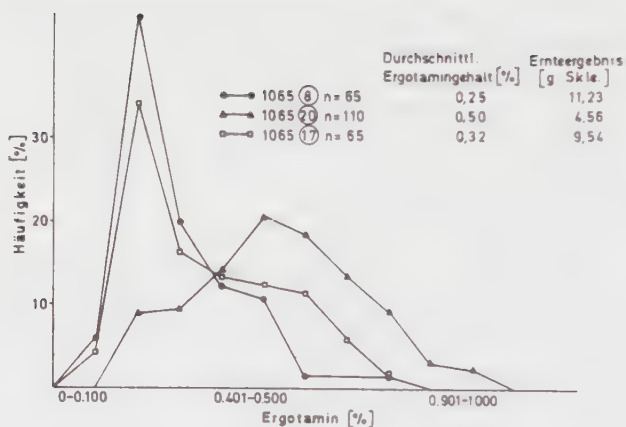


Abb. 42: Häufigkeitsverteilungen für den Ergotamingehalt von Sklerotien aus drei Monosporenkulturen des Stammes 1065.

Mit Sporensuspensionen der Einsporenkulturen 8, 17 und 20 des Stammes 1065 konnten in der beschriebenen Weise (s. Methoden) Blüten von Roggenpflanzen erfolgreich infiziert werden. Die so gewonnenen Sklerotien wurden radioimmunologisch analysiert.

Abb. 42 zeigt, daß die Alkaloidverteilungskurven für die Sklerotien aus den Einsporenstämmen 8 und 17 anders verlaufen als die vom Einsporenstamm 20. Die drei für die Anlage der Einsporenkulturen benutzten Sporen waren also genetisch unterschiedlich, woraus folgt, daß das Sklerotium 1065 genetisch inhomogen war.

Da die durchschnittlichen Alkaloidgehalte der Sklerotien der Einsporenstämmen jeweils niedriger waren als die vom Stamm 1065, ist es auch nicht möglich, mit Hilfe von Einsporenkulturen des Stammes 1065 Nachkommengenerationen mit noch höherer Alkaloid-

produktion zu erzeugen. Eine optimale Alkaloidproduktion scheint also vom Zusammenwirken aller Kerne abhängig zu sein.

6.3 Züchtung von Sklerotien mit neuem Alkaloidspektrum

Schon Békésy (1956) und Mantle (1975) vermuteten, daß ein Fruchtknoten von mehreren Sporen sogar verschiedener chemischer C. purpurea Rassen gleichzeitig infiziert werden kann, deren Hyphen dann das Sklerotium gemeinsam bilden. Es ist noch nicht geklärt, ob durch Anastomosen mit anschließendem Kernaustausch ein Heterokaryon gebildet wird oder ob die Hyphen der chemischen Rassen getrennt weiterwachsen. Békésy konnte zeigen, daß sich auf Roggenpflanzen nach einer Infektion mit einem Sporengemisch von C. purpurea Stämmen, die weiße und normalgefärbte Sklerotien ausbilden, auch gestreifte Sklerotien entwickelten. Im folgenden wird die Existenz verschiedener chemischer Rassen in einem Sklerotium an Hand von Alkaloidspektren der Sklerotien bewiesen.

Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt:

Sporensuspensionen der Stämme 208 und 1019, die beide ca. 5000 Sporen pro μ l Lösung enthielten, wurden zu gleichen Teilen gemischt. Mit der Mischlösung wurden dann Roggenblüten infiziert.

Das Muttersklerotium 208 stammte aus der Herkunft U.K.I und enthielt Ergocristin und kein Ergotamin, während das Sklerotium 1019 aus der Herkunft Indien II nur Ergotamin und kein Ergocristin enthielt (Abb. 43).

Die Sklerotien der gemeinsamen Nachkommengenerationen wurden mit beiden Peptidalkaloid RIA's analysiert. Es zeigte sich, daß alle Sklerotien Ergotamin und Ergocristin enthielten, wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen und teilweise nur in Spuren. Der durchschnittliche Alkaloidgehalt des Stammes 208 und 1019 betrug 0.49%. Er lag damit etwas höher als

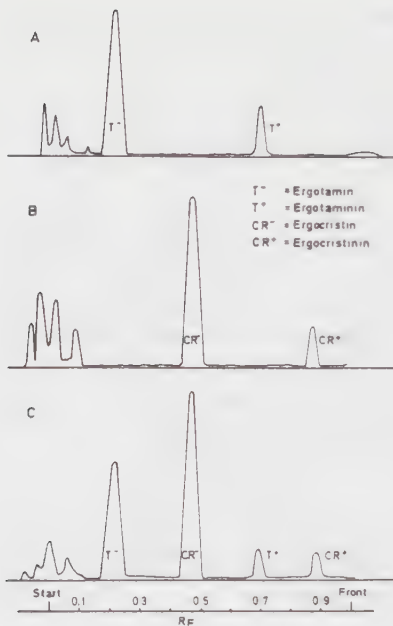


Abb. 43: Fluoreszenzintensitätsortskurven von Sklerotien verschiedener chemischer Rassen

- A) Sklerotium vom Ergotaminstamm 1019
- B) Sklerotium vom Ergocristinstamm 208
- C) Sklerotium vom Ergotamin- und Ergocristinstamm 208 und 1019

der vom Stamm 208 (0.35%), aber niedriger als der vom Stamm 1019 (0.55%). Alle Sklerotien hatten das gleiche Alkaloidspektrum (s. Abb. 43).

Für die Aufstellung der Spektren wurde ein aliquoter Teil eines Sklerotiumextraktes auf eine Kieselgeldünnschichtplatte aufgetragen und im Laufmittel Essigsäureäthylester:Dimethylformamid:Äthanol (96%):NH₃ (25%) = 130:19:1:0.2 entwickelt.

Nach dem Trocknen der Platte wurde die Fluoreszenzverteilung auf dem Chromatogramm mit dem Zeiss Spektralphotometer bestimmt (s. Methoden).

Um die genetische Stabilität der neu gewonnenen chemischen Rasse zu überprüfen, wurden Roggenpflanzen mit einer Sporensuspension vom Myzel des Sklerotiums 2730 infiziert. Das Sklerotium 2730 besaß beide Peptidalkaloide in etwa gleichem Verhältnis und stammte aus der 1. Nachkommengeneration vom Stamm 208 und 1019.

<u>C. purpurea</u> Stamm Nr.	Herkunft	Alkaloid- spektrum	Anzahl der chro- matographierten Sklerotien der 1. Nachkommen- generation	Anzucht der Sklerotien
1019	Indien II	A	10	Freiland
208	U.K.I	B	10	"
+ 1019 208	+ Indien II U.K.I	C	50	"
2730	1019 + 208	C	20	Klimakammer
2730 (1) ⁺	"	A	10	"
2730 (2) ⁺	"	A	10	"
2730 (3) ⁺	"	A	10	"
2730 (4) ⁺	"	A	10	"
2730 (5) ⁺	"	A	10	"

⁺ Impfmateriel wurde von Einsporenkulturen (1-5) des Stammes 2730 gewonnen

Tab. 17: Untersuchung der Alkaloidspektren der Sklerotien der 1. Nachkommengeneration der Stämme 208, 1019, 208 + 1019 und 2730. A, B und C geben die in Abb. 43 gezeigten Alkaloidspektren an.

Tab. 17 zeigt, daß alle getesteten Sklerotien wieder das Alkaloidspektrum C, also beide Peptidalkaloide enthielten. Durch diese Versuche konnte bewiesen werden, daß es möglich ist, mit Sporengemischen verschiedener chemischer C. purpurea Rassen Sklerotien mit neuem Alkaloidspektrum zu züchten.

Für die Gewinnung von Reinsubstanzen sind Mutterkorndrogen, die die gewünschte Substanz als Hauptalkaloid enthalten, aus wirtschaftlichen Gründen geeigneter als Sklerotienmaterial mit einem Alkaloidgemisch.

Deshalb wurde im folgenden Versuch geprüft, ob es möglich ist, mit Hilfe von Einsporenkulturen verschiedene chemische Rassen aus einem Sklerotium zu isolieren. Zu diesem Zweck wurde aus der bereits für die Roggeninfektion benutzten Sporensuspension des Stammes 2730 fünf Einsporenkulturen gewonnen. Mit ihrer Hilfe wurden parasitische Mutterkornkulturen angelegt.

In Tab. 17 ist ersichtlich, daß alle getesteten Sklerotien der fünf Kulturen das Alkaloidspektrum A besaßen, also nur Ergotamin enthielten. Theoretisch war eine Aufspaltung in Ergotamin und Ergocristinstämme zu erwarten. Da alle Kulturen wie erwähnt nur das Alkaloidspektrum A besaßen, muß angenommen werden, daß die zur Gewinnung der Einsporenkulturen benutzten Sporen rein zufallsmäßig dem Ergotaminstamm angehörten (zu kleiner Stichprobenumfang). Es kann daher angenommen werden, daß es möglich ist, aus einem genetisch inhomogenen Sklerotium Rassen mit unterschiedlichem Alkaloidspektrum zu isolieren.

6.4 Optimierung der saprophytischen Kultivierung des Stammes 202

In der Industrie werden bereits viele primäre und sekundäre Metabolite und Enzyme mit wirtschaftlicher Bedeutung wie z.B. organische Säuren, Antibiotika, Gibberelline, Alkaloide, Amylasen und Pektinasen fermentativ mit Hilfe der entsprechenden

Pilzstämme hergestellt (Martin und Demain, 1978). Für eine maximale Ausbeute an den gewünschten Metaboliten ist fast immer die Änderung der Physiologie des Pilzstammes notwendige Voraussetzung. Auf Techniken zur Selektion veränderter Genotypen eines Pilzstammes wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Die Substanzausbeute kann nicht nur durch Selektion von Hochleistungsstämmen, sondern auch durch Optimierung des Inoculums, der Medien und der Anzucht sowie durch einen geeigneten Erntezeitpunkt gesteigert werden. Bei einer solchen umfassend durchgeführten Optimierung müssen sehr viele Proben analysiert werden. Für diese Analysen ist der RIA auf Grund seiner hohen Sensitivität und Spezifität und vor allem wegen des hohen Probendurchsatzes besonders geeignet.

Exemplarisch wird im folgenden die Optimierung des C. purpurea Stammes 202 auf Ergometrin und Ergocristin mit Hilfe der hier entwickelten RIA's beschrieben. Der Stamm produzierte im Medium S II wenige mg dieser Alkaloide pro Liter Medium. Das Medium S II (s. Methoden) enthält die wesentlichen Komponenten der wichtigsten in der Literatur für die Gewinnung von Ergotalkaloiden beschriebenen Medien in durchschnittlichen Konzentrationen (s. Tab. 18): Bei allen folgenden Versuchen wurde nur der Alkaloidgehalt des Filtrates bestimmt, da in Vorversuchen ermittelt worden war, daß im Filtrat $93,5\% \pm 0,7\%$ des gesamten Ergometringehaltes und $67,1\% \pm 3,3\%$ des gesamten Ergocristingehaltes enthalten waren ($n = 10$). Wenn nicht anders angegeben, wurden die Vorkulturen im Rundkolben mit dem Medium VSII und die Produktionskulturen im Schikanekolben mit dem Medium SII (s. Methoden) bei 25°C auf einem Schüttler mit 180 upm im Dunkeln angezogen.

6.4.1 Optimierung des Inoculums

Es ist bekannt, daß eine optimale Ergotalkaloidausbeute auch vom Alter des für die Vorkultur benutzten Myzels und vom Alter

und dem Volumen des für die Produktionskultur verwendeten Inoculums abhängig ist (Taber und Vining, 1958). Deshalb wurden die Auswirkungen der Veränderungen dieser Parameter auf den Alkaloidgehalt des C. purpurea Stammes 202 untersucht.

Um die Abhängigkeit der Ergometrin- und Ergocristinproduktion vom Alter des für die Vorkultur benutzten Myzels zu untersuchen, wurden mit dem Myzel von neun verschiedenen alten Festkulturen des Stammes 202, die jeweils durch Abimpfungen aus der nächstälteren Kultur entstanden waren, Vorkulturen angelegt. Die Festkulturen, die 28 Tage und älter waren, zeigten Differenzierungen, erkennbar an rotbraun bis dunkelbraun pigmentierten Sektoren auf der Agarplatte.

Das Wachstum und die Morphologie des Myzels der verschiedenen Vorkulturen ließen keine großen Unterschiede erkennen. Der Alkaloidgehalt der mit Hilfe dieser Vorkulturen angelegten Produktionskulturen wurde mit den RIA's bestimmt. Obwohl alle mit den verschiedenen alten Myzelien angelegten Kulturen relativ gleich stark gewachsen waren (Abb. 44b) hatten nur die mit dem zehn Tage alten, undifferenzierten Myzel angelegten Kulturen einen hohen Ergometrin und Ergocristingehalt. Der Alkaloidgehalt der anderen Produktionskulturen nahm umso stärker ab, je älter die benutzten Myzelien waren.

Die Abnahme der Ergocristin- und Ergometrinbildung konnte auf die mit zunehmenden Alter fortschreitende Differenzierung oder auf eine altersbedingte Degeneration des Myzels zurückzuführen sein. Um zu entscheiden, welcher Grund ausschlaggebend war, wurden von jeder der 9 Festkulturen Abimpfungen auf Agarplatten angelegt. Aus den Myzelfragmenten wuchsen in allen Fällen zunächst wieder undifferenzierte Kulturen heran. Von diesen wurden 14 Tage später, zu einem Zeitpunkt, wo das Myzel noch nicht differenziert war, wieder Vorkulturen angeimpft. Die Analyse der entsprechenden Produktionskulturen zeigte, daß diesmal nicht nur die Trockengewichte und damit das Wachstum, sondern auch die Alkaloidgehalte relativ ein-

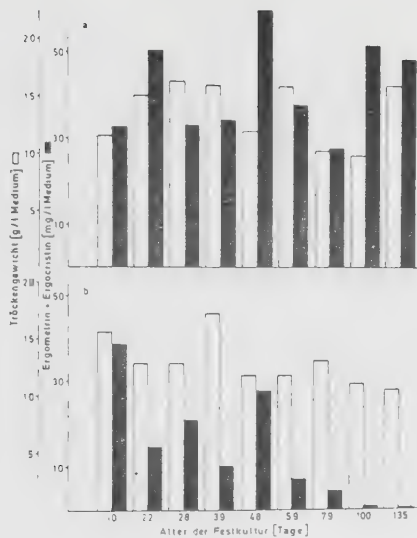


Abb. 44a-b: Abhängigkeit des Alkaloidgehaltes und des Wachstums von Submerskulturen des Stammes 202 vom Alter des für die Vorkultur benutzten Myzels

- a) bei Animpfung der Vorkulturen mit 14 Tage altem Myzel, das von Abimpfungen der unterschiedlich alten Festkulturen stammte
- b) bei direkter Animpfung der Vorkulturen mit 10 - 135 Tage altem Myzel

heitlich waren (Abb. 44a). Der Alkaloidgehalt ist also vom altersbedingten Differenzierungsgrad des zur Vorkultur benutzten Myzels abhängig.

Die Ergebnisse stellen deutlich heraus, daß Submerskulturen für die Ergotalkaloidproduktion nicht mit altem, differenziertem Myzel angeimpft werden dürfen. Falls nur differenzierte

Kulturen zur Verfügung stehen, müssen erst Abimpfungen auf Agarmedien angelegt werden, die dann in undifferenziertem Zustand benutzt werden können. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, daß der Stamm 202 hinsichtlich der Alkaloidproduktion über den beschriebenen Zeitraum relativ stabil ist (Abb. 44a).

Die Abhängigkeit der Ergocristin- und Ergometrinproduktion vom Inoculumvolumen wurde untersucht, indem Schikanekolben mit Medium SII mit verschiedenen Vorkulturmengen einer 6 Tage alten Vorkultur angeimpft wurden. 1 ml Inoculum enthielt 20 ± 5 Myzelflocken. Dabei war das Volumen des Medium SII jedesmal so bemessen worden, daß es mit den verschiedenen Inoculumvolumina zusammen 50 ml ergab. Abb. 45 a zeigt, daß ein optimaler Alkaloidgehalt nur mit einer Inoculummenge zu erzielen war, die mindestens 4 ml = 8% des Gesamtvolumens ausmachte.

In einem weiteren Versuch wurde dann noch der Einfluß des Inoculumalters auf die Alkaloidproduktion getestet. Dabei wurden die Schikanekolben mit verschieden altem Inoculum aus der gleichen Vorkultur angeimpft.

Die Vorkultur zeigte ab dem 7. Tag eine fortschreitende Differenzierung, die an einer rötlich braunen Pigmentierung erkennbar war. Produktionskulturen, die mit differenziertem Inoculum angeimpft worden waren, hatten deutlich niedrigere Alkaloidgehalte als die mit undifferenziertem Inoculum angeimpften Kulturen (Abb. 45b).

Hieraus ergibt sich, daß sowohl für die Anlage von Vorkulturen als auch für die Anlage von Produktionskulturen nur undifferenziertes Myzel benutzt werden darf. Ferner garantiert erst ein Inoculumvolumen, das mindestens 8% des Gesamtvolumens ausmacht, eine optimale Alkaloidproduktion.

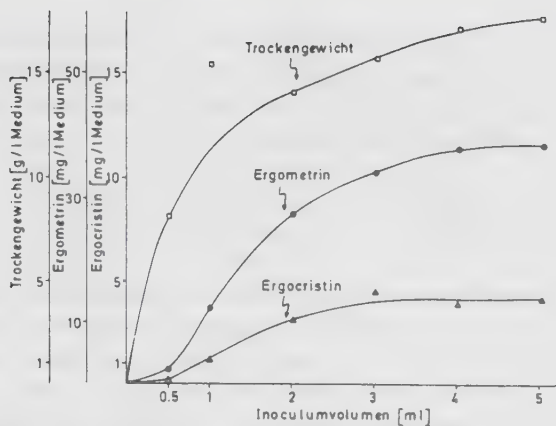


Abb. 45a: Einfluß des Inoculumvolumens auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion des Stammes 202.

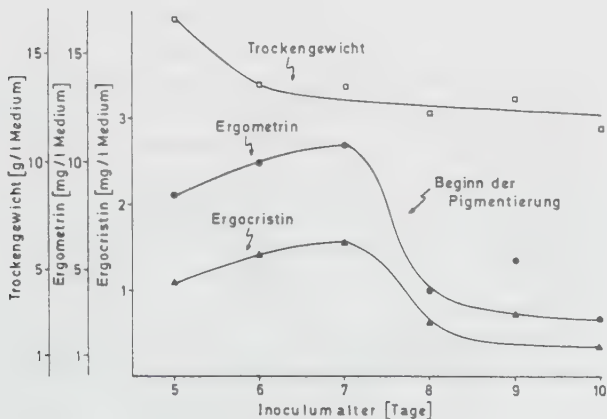


Abb. 45b: Abhängigkeit des Wachstums und der Alkaloidproduktion des Stammes 202 vom Alter des Inoculums.

6.4.2 Kinetik der Alkaloidbildung in Submerskulturen

Der zeitliche Verlauf des Wachstums und der Alkaloidproduktion des Stammes 202 in saprophytischer Kultur im Medium SII wurde verfolgt, um für die nachfolgenden Versuche einen geeigneten Zeitpunkt für die Ernte der Produktionskulturen zu ermitteln.

Zu diesem Zweck wurden Schikanekolben mit dem gleichen Inoculum angeimpft und zu verschiedenen Zeiten abgeerntet.

Die Wachstumskurve (ermittelt an Hand der Trockengewichte) zeigte einen für Mikroorganismen typischen Verlauf mit einer lag und log Phase sowie einer Phase verminderten Wachstums und einer stationären Phase (Abb. 46). Die Alkaloidproduktion begann nach dem dritten Tag und war nach dem sechsten Tag abgeschlossen. Der Ergocristin- und Ergometringehalt der Kulturen war danach relativ konstant (Abb. 46). Aus diesem Grunde wurden die Kulturen bei allen Versuchen nach 6 Tagen abgeerntet.

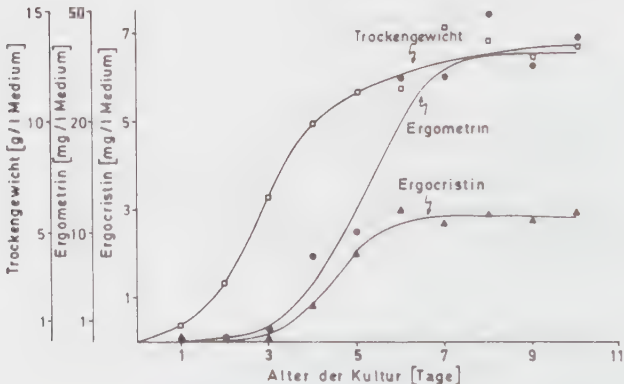


Abb. 46: Kinetik des Wachstums und der Alkaloidbildung des Stammes 202 bei saprophytischer Kultivierung im Produktionsmedium S II.

6.4.3 Optimierung des Mediums

Es ist bekannt, daß die Ergotalkaloidproduktion von C. purpurea Stämmen sehr stark vom Medium abhängig ist. Deshalb wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um ein besonders geeignetes Medium für den Stamm 202 zu finden. Zuerst wurden verschiedene in der Literatur angegebene Medien getestet, in denen schon mit verschiedenen C. purpurea Stämmen sehr hohe Ergometrin- und Peptidalkaloidgehalte (teilweise > 1 g Gesamtalkaloide/l Medium) erzielt worden waren. Dann wurden die Konzentrationen der Komponenten des Produktionsmediums SII variiert und verschiedene Medienzusätze getestet.

In Tab. 18 sind die Medien, in denen der Stamm 202 kultiviert wurde, zusammengestellt. Alle Produktionsmedien wurden mit dem gleichen Inoculum angeimpft. Nach der sechstägigen Kultivierungszeit deuteten schon unterschiedliche Färbungen der Kulturen (rot, rosa, gelb, weiß) auf verschiedene Sekundärstoffproduktionen hin. Der Alkaloidgehalt in einigen Medien (beispielsweise Medium M) war bei vergleichbarem Wachstum mehr als 500 mal so hoch wie in anderen (Medium E). Die Ergometrin- und Ergocristingehalte waren korreliert ($r = 0,988$).

Vergleicht man die Höhe der Alkaloidproduktion mit den Komponenten der Medien, so fallen gewisse Gemeinsamkeiten auf. In den Medien B, D und S, die kein $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ enthielten, wuchs der Pilz nur schwach und produzierte nur geringe Alkaloidmengen. Die unterschiedlichen Anforderungen verschiedener C. purpurea Stämme an das Medium werden an diesem Beispiel besonders deutlich, da nach den Literaturangaben andere C. purpurea Stämme in diesen Medien mehr als 1 g Peptidalkaloide produziert haben. Die Medien C, E und O, die überdurchschnittlich viel KH_2PO_4 enthielten, ermöglichten dem Stamm 202 zwar ein gutes Wachstum, aber keine hohe Ergometrin- und Ergocristinproduktion. Beides wurde dagegen in den Medien H, K, M und N, die mit 300 g/l Medium überdurchschnittlich viel Saccharose enthielten, erzielt.

Literatur- angabe	Amici et al. (1966)	Amici et al. (1966)	Amici et al. (1966)	Amici et al. (1966)	Amici et al. (1969)	Societa Farmaceutica Italia (1969)	Amici et al. (1974)	Amici et al. (1974)	Amici et al. (1966)	N	O	Gyar	Kybal (1965)	Kybal (1965)	Arca- none (1970)
Medium	B	C	D	E	G	H	I	J	K	M	N	O	P	Q	S
Sorbit (g)													15	25	
Mannit (g)				40											
Glucose (g)	100	50		10	80		100	80		300	300	100	40	75	300
Saccharose (g)					60	300	75	60							
Glycerin (ml)					60		75	60							
Asparagin (g)	10														
Cystein (mg)	10														
Äpfels. (g)		30													
Bernstein- säure (g)			10	20											
Zitronen- säure (g)															
KCL (g)	0,15				15		18,75	15	15	15	15	10	3	5	15
KH ₂ PO ₄ (g)	0,3	1	0,5		0,13		0,16	0,13	0,13	0,12	0,12				
MgSO ₄ ·7H ₂ O (mg)				1	0,5		0,16	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	0,25	0,25	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O (mg)		0,3		0,3	0,5		0,63	0,5	0,5	0,25	0,5	1	0,25	0,25	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (mg)					7		9	7	7	7	7				7
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (g)	1,44				6		7,5	6	6	6	6	1,44	1,5	1,5	6
Pepton (g)				10						1					
Hefeextrakt (g)	0,1	10			0,1		0,13	0,1	0,1	0,1	0,1		1		
NH ₃ (ml)															
Bidest (ml) ad	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	3,2	5,4	2,56
Leitungs- wasser (ml) ad															1000
pH	5,6	5,2	5,2	4,8	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,6	6,3	6,3	5,2

TC (g/l Med.)	3,3	10,7	0,5	16,6	17,3	6,4	17,2	21,2	6,7	14,7	11,3	11,4	9,9	13,6	1,8
Ergometrin (mg/l Med.)	0,2	0,2	0,2	0,2	2,5	10,96	2,0	2,5	7,9	55,2	26,6	1,5	6,6	24,2	0,3
Ergocristin (mg/l Med.)	0,03	0,02	0,02	0,02	0,51	1,34	0,26	0,46	0,99	11,5	4,2	0,29	0,48	3,97	0,21

Tab. 18: Wachstum und Alkaloidproduktion des Stammes 202 in 16 verschiedenen Medien.

In allen Fällen war ausnahmslos der Alkaloidgehalt mit der Farbe korreliert. Produktionskulturen mit hohem Gehalt waren rot bis rosa, solche mit niedrigem Alkaloidgehalt, aber gutem Wachstum, gelb und die mit niedrigem Gehalt und schlechtem Wachstum weiß.

Einen Vergleich der Ergometringehalte und der Trockengewichte von Parallelproben zeigt Abb. 47. Aus der guten Übereinstimmung ist erkennbar, daß sowohl Alkaloidproduktion als auch Wachstum bei gleichen Anzuchtbedingungen nur vom Medium und nicht von Zufallsfaktoren abhängig sind.

Im folgenden wurde der Einfluß der Konzentration der Medienkomponenten des in Vorversuchen erprobten Mediums SII auf die Alkaloidproduktion untersucht. Dabei wurde die Konzentration einer Substanz variiert, während die anderen unverändert blieben. Bei der Konzentrationsänderung von Bernsteinsäure wurde zwangsläufig auch die Ammoniakmenge variiert, weil die Bernsteinsäurelösung mit Hilfe von Ammoniak auf den pH-Wert von 5.2 eingestellt wurde. Die beiden Komponenten lagen also immer

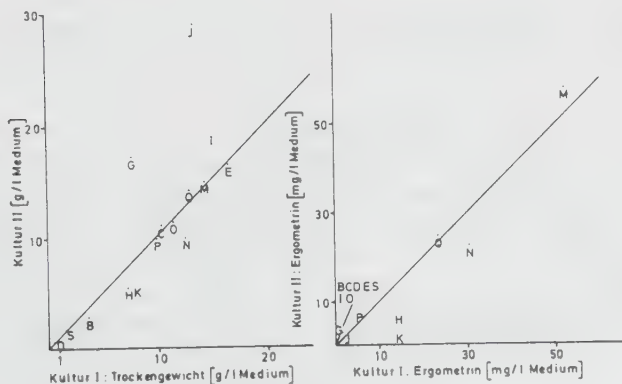


Abb. 47: Korrelation zwischen den Ergometringehalten und Trockengewichten von in 16 verschiedenen Medien angezogenen Parallelkulturen des Stammes 202.

im gleichen Verhältnis vor, und nur ihr gemeinsamer Einfluß auf die Alkaloidproduktion wurde untersucht.

Unterschiedliche Bernsteinsäure/Ammoniak-, Saccharose-, Mg SO_4 - und KH_2PO_4 -Konzentrationen beeinflussen, wie schon aus den Ergebnissen von Kapitel 6.4.3 vermutet werden konnte, das Wachstum und die Alkaloidproduktion sehr stark. Während diese beiden Parameter bei Konzentrationserhöhungen der ersten drei Komponenten fast parallel anstiegen und ab einer bestimmten Konzentration nahezu konstant blieben, nahm der Alkaloidgehalt bei hohen KH_2PO_4 Konzentrationen (trotz unverändertem Wachstum des Pilzes) wieder stark ab (Abb. 48).

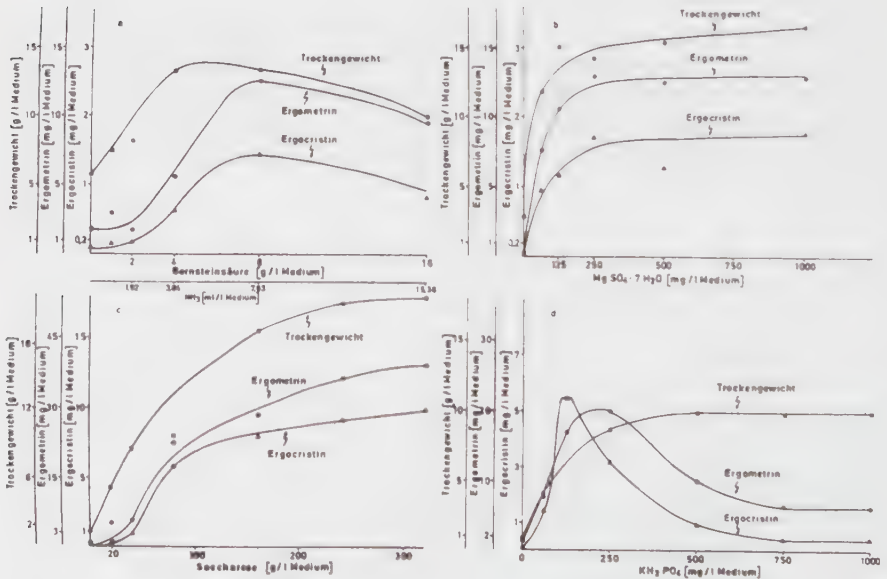


Abb. 48: Einfluß der Bernsteinsäure/ NH_3 -(a), $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -(b), Saccharose-(c) und KH_2PO_4 (d) Konzentration des Produktionsmediums S II auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion des Stammes 202.

Das Ergebnis ist übereinstimmend mit der Feststellung einiger Arbeitsgruppen, daß die Alkaloidproduktion erst dann beginnt, wenn der Phosphatlevel im Medium erschöpft ist (Amici et al., 1967, Amici et al., 1969, Arcamone et al., 1970).

Bei zu hohen KH_2PO_4 Konzentrationen im Medium wurde vom Pilz nicht mehr alles KH_2PO_4 aufgenommen. Da der Phosphatlevel des Mediums deshalb nicht erschöpft war, unterblieb eine stärkere Alkaloidbildung.

Die Ergometrin- und Ergocristinausbeute wurde nur bei einer nicht optimalen Bernsteinsäure/ NH_3 Konzentration durch Asparagin erhöht, woraus geschlossen werden kann, daß der Pilz diese Komponenten gleichermaßen für die Gewinnung von Stickstoff und organischen Säuren heranziehen konnte. Die weiteren Komponenten des Produktionsmediums S II hemmten in höheren Konzentrationen die Alkaloidbildung (ZnSO_4) oder hatten keinen großen Einfluß auf sie (KCl).

Zur Vervollständigung der Mediumoptimierung wurde dann noch versucht, die Ausbeute an den beiden Alkaloiden durch den Zusatz von biosynthetischen Vorstufen wie Tryptophan, Prolin und Phenylalanin sowie osmotisch wirksamen Substanzen wie NaCl und Sorbit zum Produktionsmedium S II zu erhöhen.

Es ist bekannt, daß der Zusatz von Tryptophan ins Produktionsmedium bei einigen C. purpurea Stämmen die Ergotalkaloidproduktion erhöht (Floss und Mothes, 1964, Bu'Lock und Barr, 1968, Vining, 1970), bei anderen jedoch nicht (Bu'Lock, 1974). Dabei wird angenommen, daß Tryptophan die Bildung von Enzymen induziert, die an der Bildung des Alkaloidgrundgerüsts beteiligt sind. Die Ergometrin- und Ergocristinbildung konnte durch Zusätze von Tryptophan in den Konzentrationen von 50 mg - 500 mg pro Liter Medium nicht erhöht werden.

Prolin und Phenylalanin sind an der Biosynthese des Peptidteils von Ergocristin beteiligt (Floss, 1976). Zusätze dieser

Aminosäuren in den Konzentrationen von 50 mg - 500 mg pro Liter Medium steigerten die Ergocristinproduktion ebenfalls nicht.

Wack et al. (1975) hatten durch die Erhöhung des osmotischen Wertes des Mediums durch NaCl und anderen Salzen (5-50 g/l Medium) den Alkaloidgehalt von Kulturen bestimmter C. purpurea Stämme um das 5 - 10 fache steigern können.

Auch die Ergometrin und Ergocristinbildung des Stammes 202 konnte durch NaCl oder Sorbit Zugaben wohl auf Grund der Erhöhung des osmotischen Wertes des Mediums gesteigert werden (Abb. 49).

Der Zusatz von 16 g NaCl pro Liter Medium erhöhte die Ergometrinbildung um ca. 250% und die Ergocristinbildung sogar um ca. 450%. Durch die Zugabe von 160 g Sorbit pro Liter Medium wurde die Bildung dieser Alkaloide um ca. 200% bzw. ca. 350% gesteigert.

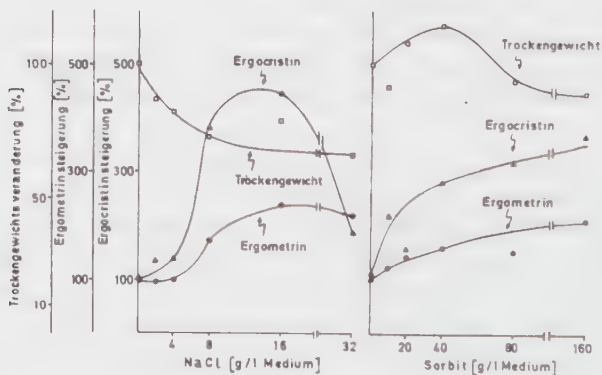


Abb. 49: Einfluß von verschiedenen NaCl- und Sorbit-Konzentrationen auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion des Stammes 202.

Von allen osmotisch wirksamen Substanzen dürfte NaCl auf Grund seines Preises und der Tatsache, daß es die Viskosität des Mediums nicht verändert, am geeignetsten sein.

Die oben aufgeführten Ergebnisse haben gezeigt, daß die Alkaloidproduktion des Stammes 202 in saprophytischer Kultur in hohem Maße von den Medienkomponenten und deren Konzentrationen abhängig ist. Produktionssteigerungen konnten durch den Zusatz von osmotisch wirksamen Substanzen, nicht aber durch biosynthetische Vorstufen, erreicht werden.

6.4.4 Optimierung der Anzuchtbedingungen

Die optimale Alkaloidproduktion des Stammes 202 in saprophytischer Kultur war nun nicht nur von einem geeigneten Medium und Inoculum abhängig, sondern auch von den Anzuchtbedingungen. Dabei wurde der Einfluß von Licht, Temperatur, Schüttelgeschwindigkeit und dem pH-Wert des Mediums sowie die Abhängigkeit von der Form des Produktionskolbens untersucht.

Um die Abhängigkeit der Alkaloidproduktion vom Kolbentyp zu testen, wurden von 10 Myzelisolaten des Stammes 202 (s. Kapitel 6.5.1) Vorkulturen angelegt. Mit dem Inoculum aus den Vorkulturen wurden jeweils 2 Schikanekolben und 2 Rundkolben angeimpft. Die Alkaloidproduktion im Schikanekolben war ca. 5-fach höher als im Rundkolben (Tab. 19). Die Gründe liegen darin, daß durch die im Schikanekolben eingearbeitete Kerbe die Bildung von Pellets (Myzelklumpen) verhindert und dadurch eine möglichst hohe Homogenität des Mediums aufrechterhalten wurde.

Außerdem wurde das Myzel durch die stärkere Turbulenz infolge des durch die Kerbe gebildeten Widerstandes besser mit Sauerstoff versorgt.

Kultivierungsgefäße:	Rundkolben	Schikanekolben
Anzahl der unter suchten Kulturen	10	10
durchschnittlicher Ergometringehalt (mg/l Medium)	6,80 $\pm$ 2,22	34,79 $\pm$ 9,22
durchschnittliches Trockengewicht (g/l Medium)	16,8 $\pm$ 1,8	14,4 $\pm$ 1,2

Tab. 19: Einfluß der benutzten Kolbentypen auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion des Stammes 202. Das Inoculum enthielt 15 $\pm$ 5 Myzelflocken.

Für die Untersuchung der Temperatur- und Lichtabhängigkeit wurden Schikanekolben mit dem Inoculum aus einer Vorkultur angeimpft und bei drei verschiedenen Temperaturen (21°C, 25°C, 30°C) auf Rotationsschüttlern mit gleicher Schüttelgeschwindigkeit (180 upm) angezogen. Der höchste Alkaloidgehalt wurde bei 25°C erreicht (Abb. 50). Bei 30°C enthielt das Kulturfiltrat jedoch kaum noch Alkaloide, was auf das geringe Wachstum des Pilzes bei diesen Temperaturen zurückzuführen war. Aus technischen Gründen konnte nur bei einer Temperatur von 21°C die Lichtabhängigkeit getestet werden. Der Alkaloidgehalt der im Dunkeln angezogenen Kulturen war um ca. 80% größer, was vielleicht durch die leichte Zersetzbarkeit der Ergotalkaloide unter Lichteinfluß erklärt werden könnte.

Um die Abhängigkeit der Alkaloidproduktion von der Schüttelgeschwindigkeit zu untersuchen, wurden Parallelkulturen auf vier verschiedenen Rotationsschüttlern bei gleicher Temperatur (25°C), aber verschiedenen Schüttelgeschwindigkeiten angezogen. Die Alkaloidproduktion und das Wachstum wurden von Schüttelgeschwindigkeiten zwischen 140 und 220 upm nur unwe-

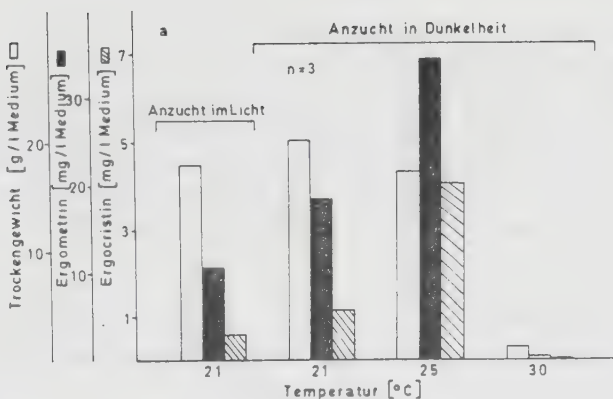


Abb. 50: Einfluß von Temperatur und Licht auf das Wachstum und die Alkaloidproduktion des Stammes 202.

sentlich beeinflusst. Beide Parameter nahmen bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 upm ab, weil diese Geschwindigkeit nicht mehr ausreicht, das Myzel homogen zu halten und evtl. ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen.

Für die Ermittlung der pH Abhängigkeit wurde das Produktionsmedium auf pH-Werte zwischen 4 und 7 mit 1n HCl bzw. 5%iger NH_4OH Lösung eingestellt. Die Medien wurden alle mit dem gleichen Inoculum angeimpft. Bei der Untersuchung der Filtrate, deren pH-Werte je nach dem pH-Wert des Ausgangsmediums zwischen 4, 6 und 6,1 lagen, zeigte sich, daß die Alkaloidproduktion relativ unabhängig vom pH-Wert war. Lediglich der Ergometrin-gehalt der Kulturen nahm mit steigenden pH-Werten leicht zu.

Es konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, daß die Form des Produktionskolbens und die Anzuchttemperatur den größten Einfluß auf die Ergometrin- und Ergocristinbildung hatten, wäh-

rend die Schüttelgeschwindigkeit, das Licht und der pH-Wert des Mediums eine nicht so entscheidende Rolle spielten.

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, daß durch die Veränderung des Inoculums, des Mediums und der Anzuchtbedingungen die Physiologie des Pilzes, und damit die Alkaloidproduktion, kontrolliert werden kann. Nur wenn alle der zahlreichen Faktoren, die die Alkaloidbildung beeinflussen, optimal eingestellt sind, kann der Pilz den physiologischen Zustand erreichen, der eine maximale Produktion an Alkaloiden ermöglicht.

6.5 Versuche zur Selektion von Hochleistungsstämmen für die saprophytische Alkaloiderzeugung

Auch für Pilze gelten die drei Basismethoden, nach denen Hochleistungsstämmen für die Produktion einer gewünschten Substanz erzeugt werden können: 1. durch Selektion, 2. durch mutagene Behandlung mit anschließender Selektion und 3. durch Kreuzung mit anschließender Selektion. Aus der Literatur sind eine Fülle von Beispielen bekannt, wo nach diesen Verfahren Hochleistungsstämmen erzeugt werden konnten (Johnston, 1974).

Aus Zeitgründen wurde in dieser Arbeit nur nach dem 1. Verfahren vorgegangen. Es wurde versucht, Hochleistungsstämmen zu isolieren mit Hilfe von selektierten Sklerotien aus verschiedenen geographischen Herkunftten und mit Hilfe von selektierten Myzelisolaten. und Sklerotien des Stammes 202.

In Kapitel 6.2 wurde bereits beschrieben, daß die mit Hilfe der selektierten Sklerotien angelegten saprophytischen Kulturen keine oder nur sehr geringe Alkaloidmengen produzierten.

6.5.1 Selektion auf alkaloidreiche Myzelisolate des Stammes 202

Es ist bekannt, daß die Alkaloidproduktion von C. purpurea

und C. paspali Stämmen durch Selektion von geeigneten Myzelisolen gesteigert werden kann (Kelleher, 1969). Dabei werden mit den verschiedenen Myzelisolaten Produktionskulturen hergestellt, die dann auf ihren Alkaloidgehalt untersucht werden. Die Anlage der Produktionskulturen ist sehr aufwendig und verhindert einen großen Probendurchsatz. Die Empfindlichkeit der RIA Bestimmung erlaubt jedoch, schon die Myzelisolate auf ihren Alkaloidgehalt zu testen, und dann nur mit selektierten Myzelisolaten Produktionskulturen anzulegen.

Die Myzelisolate des Stammes 202 wurden wie im Methodenteil beschrieben auf dem Agarmedium AS II, das die gleichen Komponenten in den gleichen Konzentrationen enthielt wie das Produktionsmedium S II (s. Methoden), angelegt. Aus dem Zentrum von 85 durch Myzelisolate entstandenen Kulturen wurde nach 12 Tagen je ein kreisrundes Myzelstück ($r = 0,5$ cm) ausgestantzt, das dann in 2 ml 50% wässriger Acetonlösung, die 2% Weinsäure enthielt, extrahiert wurde. Anschließend wurden die Extrakte verdünnt (1:10) und mit dem Ergometrin RIA analysiert.

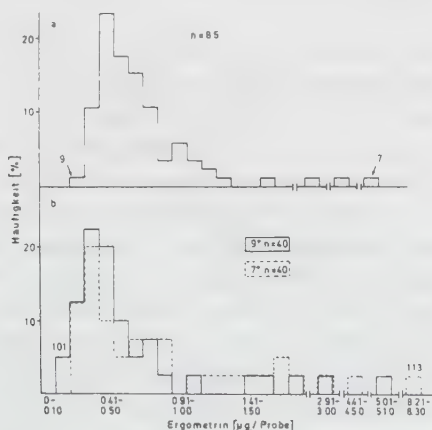


Abb. 51: Häufigkeitsverteilungen für den Ergometringehalt von Myzelisolaten (Festkulturen) des Stammes 202 (a) und den ersten Nachkommengenerationen von daraus selektierten Myzelisolaten (b).
+ 1. Nachkommengeneration

Abb. 51a zeigt, daß die Myzelisolate beträchtliche Unterschiede im Alkaloidgehalt aufweisen. Um zu klären, ob diese Ursachen genetisch oder modifikatorisch bedingt waren, wurden von der Myzelkultur mit dem niedrigsten (Nr. 9) und der mit dem höchsten (Nr. 7) Ergometringehalt wieder Myzelisolate, wie oben beschrieben, gewonnen, extrahiert und analysiert. Es zeigte sich, daß die Alkaloidverteilungen der Myzelisolate der Mutterkulturen Nr. 7 und Nr. 9 ähnlich waren (Abb. 51b). Die Analyse der Alkaloidgehalte der Myzelisolate der Kulturen Nr. 101 und Nr. 113 (s. Abb. 51b), die aus der ersten Nachkommengeneration der Kultur Nr. 7 stammten, brachte ein vergleichbares Ergebnis. Daraus folgt, daß zumindest bei den Kulturen Nr. 7, Nr. 9 und Nr. 101 und Nr. 113 die unterschiedlichen Alkaloidgehalte modifikatorisch bedingt waren. Diese Folgerung erklärt auch die geringen Unterschiede im Alkaloidgehalt (zwischen 25,6 mg und 42,1 mg pro Liter Medium) von Produktionskulturen, die aus fünf alkaloidreichen und fünf alkaloidarmen Myzelisolaten aus der 1. Selektion (Abb. 51a) angelegt worden waren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei dieser Selektionsuntersuchung kein Hochleistungsstamm selektiert werden konnte, was eventuell auf die relative Stabilität des benutzten Stammes 202 (s. Kapitel 6.4.1) zurückzuführen ist. Jedoch dürften bei der Verwendung anderer Stämme sowie durch die mutagene Behandlung von Myzelien und Sporen mit anschließender Selektion der daraus gewonnenen Myzel- und Einsporenisolaten mit der beschriebenen Methode Hochleistungsstämme für die saprophytische Alkaloiderzeugung gewonnen werden. Auf Grund des geringen Aufwandes bei der Anzucht, Ernte und Extraktion der Kulturen sowie des mit dem RIA erreichbaren hohen Probendurchsatzes besteht die Möglichkeit, bei dieser Methode sehr umfangreiche Selektionen durchzuführen. Darüber hinaus sollte es möglich sein, mit dieser Selektionstechnik nicht nur besser produzierende Stämme zu selektieren, sondern auch degenerierte Hochleistungsstämme wieder zur vollen Produktionsfähigkeit zu regenerieren.

6.5.2 Versuche zur Steigerung der Alkaloidproduktion über Sklerotien des Stammes 202

Der Stamm 202, der auf dem Medium AS II keine Sporen bildete, sporulierte auf dem Agarmedium A (s. Methoden). Mit den Sporen konnten in der bereits beschriebenen Weise auf Roggenpflanzen Sklerotien erzeugt werden. Die Sklerotien waren sehr klein und zum großen Teil degeneriert, was in der Literatur für andere C. purpurea Stämme, die jahrelang in saprophytischer Kultur gehalten worden waren, beschrieben ist (Békésy, 1956). Die auf das Agarmedium aufgelegten 20 Sklerotien bildeten innerhalb von 14 Tagen Myzel, aus dem Produktionskulturen angelegt werden konnten. Diese wurden mit den RIA's auf ihren Alkaloidgehalt untersucht.

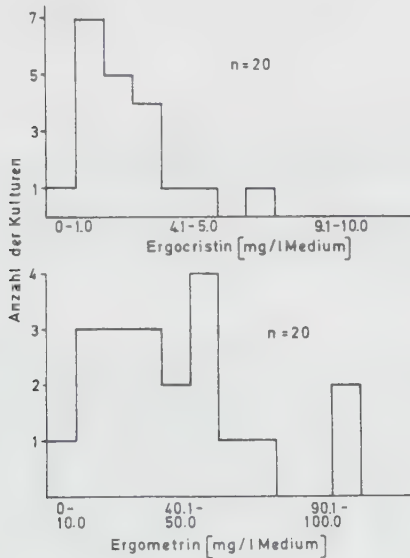


Abb. 52a: Verteilung für den Ergometrin- und Ergocristingehalt von saprophytischen Kulturen aus Sklerotien des Stammes 202.

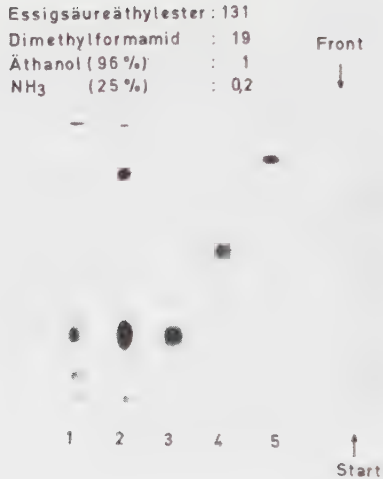


Abb. 52b: Alkaloidspektrum eines Kulturfiltrates und eines Sklerotienextraktes des Stammes 202.
 Laufmittel: Essigester:DMF:Äthanol (96%):NH₃ (25%)
 138 12 1 0,2
 Sprühreagenz: Van Urk (Stahl und Kaldewey, 1961)
 1: Sklerotiumextrakt, 2: Kulturfiltrat,
 3: Ergometrin, 4: Ergotamin, 5: Ergocristin.

Abb. 52a zeigt, daß alle Kulturen Ergometrin und Ergocristin enthielten, teilweise in höheren Konzentrationen als in den saprophytischen Kulturen des Mutterstammes 202. Die Ergometrin- und Ergocristingehalte der Kulturen waren korreliert $r = 0.940$. Das Alkaloidspektrum der Sklerotien und der saprophytischen Kulturen war identisch (Abb. 52b). Der zusätzliche Fleck in der Chromatogrammbahn 1 kam durch einen Sklerotienfarbstoff zustande.

Um die Stabilität der neugewonnenen Tochterstämme zu überprüfen, wurden ca. 1 Monat später von den zwei Stämmen mit den niedrigsten und den höchsten Alkaloidgehalten neue Produktions-

kulturen angelegt. Dabei besaßen letztere wieder die höchsten Ergometrin- und Ergocristingehalte, jedoch war der Alkaloidgehalt auf 24,6 mg bzw. 20,5 mg pro Liter Medium gefallen.

Die Ergebnisse zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, über parasitische Mutterkornkulturen neue Hochleistungsstämme für die saprophytische Alkaloiderzeugung zu gewinnen. Die Stabilität der so gewonnenen Stämme muß jedoch umfangreicher überprüft werden als es hier aus Zeitgründen geschehen konnte.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, daß Sklerotien, bei -20°C aufbewahrt, jahrelang haltbar sind und so im Falle einer Degeneration der saprophytischen Kultur immer wieder neue Kulturen mit gleicher Alkaloidproduktion aus den Sklerotien angelegt werden können. Saprophytische Hochleistungsstämme können also mit Hilfe von Sklerotien stabilisiert werden.

IV. Diskussion

=====

Für die Bestimmung von ungefärbten pflanzlichen Sekundärmetaboliten in Gegenwart eines hohen Überschusses an Fremdstoffen fehlte lange Zeit eine hochempfindliche, einfach und schnell durchzuführende Analysenmethode. Eine solche Methode wurde besonders beim Screening auf Pflanzeninhaltsstoffe (großer Probendurchsatz) und bei Optimierungen von pflanzlichen Gewebe- oder saprophytischen Pilzkulturen (geringe Substanzmenge) vermißt. Erst der von Weiler und Zenk (1977) für die Bestimmung von Digoxin in Digitalis lanata Ehrh. erstmals eingesetzte Radioimmunoassay ermöglicht den für Optimierungen und Selektionsuntersuchungen notwendigen hohen Probendurchsatz bei gleichzeitiger hoher Spezifität und Sensitivität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel von Serpentin, Rauhasin und Ajmalin untersucht, ob der Radioimmuntest auch für die Selektion von Catharanthus roseus Hochleistungspflanzen bzw. für die Optimierung von Rauwolfia vomitoria Gewebekulturen geeignet ist. Am Beispiel von Ergotamin, Ergocristin und Ergometrin wurde diese Analysenmethode erstmals für die Bestimmung von Pilzinhaltsstoffen bei der Selektion von parasitischen und saprophytischen C. purpurea Hochleistungsstämmen und bei der Optimierung einer saprophytischen C. purpurea Kultur eingesetzt.

Die Notwendigkeit, auf den oben genannten Gebieten eine neue Analysenmethode einzuführen, ergab sich, da die bislang benutzten Nachweisverfahren ausnahmslos zu aufwendig und teilweise zu unempfindlich sind. Tab. 20 zeigt am Beispiel der verschiedenen Ergotalkaloidbestimmungsmethoden die Sonderstellung, die der RIA bezüglich der Nachweisempfindlichkeit und der Probenkapazität im Vergleich zu anderen routinemäßig durchgeführten Analyseverfahren einnimmt. Die Sensitivität der in dieser Arbeit aufgestellten Radioimmuntests ist ca. um den Faktor 10^2 höher als die fluorimetrische (Eich und Schunack, 1975) und mindestens um den Faktor 10^3 höher als andere dünn-

Nachweismethode	Meßbereich	Präzision (V%)	Probenkapazität pro Tag und Per- son	gemessene Substanz	Literaturangabe
Kombination von DC und Colorimetrie	10 µg - 50 µg	4 - 6	30 - 50	versch. Peptid- ergotalkaloide	Szepesi et al., 1979 Kirchhoefer, 1978 Keipert und Voigt, 1972
Kombination von DC und Fluorimetrie	0,1 µg - 2 µg	2 - 4	30 - 50	"	Eich und Schunack, 1975
HPLC	1 µg - 5 µg	2 - 4	20 - 30	"	Szepesi et al., 1978
GC	5 µg - 20 µg	2 - 4	10 - 20	"	Szepesi und Gazdag, 1976
RIA	2 ng - 50 ng	5 - 7	200 - 300	Ergotamin	diese Arbeit
"	0,5 ng - 20 ng	5 - 7	"	Ergocristin	"
"	0,2 ng - 10 ng	3 - 5	"	Ergometrin	"
"	0,3 ng - 30 ng	3 - 5	"	Lysergsäure	"

Tab. 20 Probenkapazität, Sensitivität und Präzision von verschiedenen Bestimmungsmethoden für

Ergotalkaloide. Die Probenkapazität wurde, wenn in der Literatur nicht angegeben, abgeschätzt. $V(\%) = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}}$

V = Variationskoeffizient, s = Standardabweichung, $\bar{x}$ = Probenmittelwert.

schichtchromatographische (Szepesi et al., 1979, Kirchhoefer, 1978, Keipert und Voigt, 1972), gaschromatographische (Szepesi et al., 1976) und hochdruckflüssigkeitschromatographische (Szepesi et al., 1978) Bestimmungsmethoden. Die Größenordnung der angegebenen Werte gilt auch für chromatographische Methoden zur Bestimmung von Serpentin, Raubasin und Ajmalin (vgl. Los und Court, 1969, Görög et al., 1976).

Die hohe Sensitivität des Radioimmuntest wird primär durch die hohe Nachweisempfindlichkeit der radioaktiv markierten Verbindungen und die hohe Spezifität immunologischer Reaktionen ermöglicht und kann nur bei optimalen Testbedingungen erreicht werden. Eine Steigerung der Empfindlichkeit ist durch die Auswahl geeigneter Antisera (s. Abb. 22) oder die Erniedrigung der markierten Antigen- und Antikörpermenge (s. Abb. 13) möglich. Die Sensitivität aller in dieser Arbeit beschriebenen Radioimmuntests ist so hoch, daß Extrakte und Filtrate für die Alkaloidbestimmung mindestens 1:10 verdünnt werden müssen, damit die Alkaloidgehalte der Proben aus dem linearen Meßbereich der Standardkurven durch graphische Interpolation ermittelt werden können.

Auf Grund dieser hohen Empfindlichkeit kann eine kleine repräsentative Probe (bspw. ein Sklerotiumstück oder eine Myzelprobe ($r = 0,5 \text{ cm}$)) analysiert werden, die eine Aussage über den Alkaloidgehalt des ganzen Untersuchungsobjektes erlaubt. Eine einfache Probenentnahme ist wiederum Voraussetzung für eine hohe Probenkapazität, da aufwendige Verfahren (bspw. Extraktion einer ganzen Pflanze oder eines ganzen Sklerotiums) den Probendurchsatz stark limitieren.

Die zweite Voraussetzung für das Erzielen hoher Probenserien ist die hohe Spezifität der in dieser Arbeit beschriebenen Radioimmuntests, die die Bestimmung der entsprechenden Substanzen aus ungereinigten Filtraten und Extrakten erlaubt. Bei anderen Analysemethoden (DC, GC, HPLC usw.) sind die erforderlichen Trenn- und Reinigungsschritte sehr zeitaufwendig, was den Probendurchsatz ebenfalls stark limitiert.

Die Bestimmungen von Kreuzreaktionen (s. Tab. 6 und 11) zeigen, daß alle benutzten Antikörper die gewünschte Spezifität besitzen. Die Spezifität der Antikörper ist direkt von der Kopplungsstelle des Haptens an das Bovinserumalbumin abhängig, was auch in der Literatur an vielen Beispielen gezeigt worden ist (Lindner et al., 1972, Kuss et al., 1972, Exley et al., 1971, Den Hollander et al., 1974).

Die Antikörper besitzen erwartungsgemäß hohe Kreuzreaktionen gegen die Derivate, die sich nur in der Kopplungsstelle vom Antigen unterscheiden, während sie gegen Derivate, die strukturelle Unterschiede in anderen Molekülbereichen als der Kopplungsstelle aufweisen, keine Kreuzreaktionen zeigen. Ein klassisches Beispiel dazu sind die spezifischen und die polyspezifischen Lysergsäureantikörper (s. Abb. 31). Die Höhe der Kreuzreaktion richtet sich nach dem Grad der strukturellen Unterschiede in der Nähe des Kopplungsbereiches. Die gewünschten hohen Kreuzreaktionen der Lysergsäureantikörper können sowohl für ein Screening auf mehrere Lysergsäurederivate als auch für die Bestimmung einer Einzelsubstanz, wie am Beispiel des Ergometrins gezeigt wird (s. Kapitel 5.6), benutzt werden.

Es kann für die radioimmunologische Bestimmung von allen in dieser Arbeit beschriebenen Indolalkaloiden gezeigt werden, daß in Extrakten oder Filtraten vorkommende Fremdsubstanzen die Meßwerte nicht entscheidend erhöhen (Abb. 15, 25, 32). Der Grund liegt darin, daß die wenigen Substanzen, gegen die hohe Kreuzreaktionen gemessen wurden, in den entsprechenden Lösungen nur in Spuren vorkommen.

Die Richtigkeit der radioimmunologischen Bestimmungen wird in hohem Maße von der Spezifität des benutzten Antiserums beeinflusst. Sie kann für die in dieser Arbeit beschriebenen Tests durch die enge Korrelation (Ajmalin $r = 0,94$, Ergotamin $r = 0,98$, Ergocristin $r = 0,96$) mit dem fluorimetrischen Nachweisverfahren nach erfolgter dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Substanzen bewiesen werden..

Die dritte notwendige Voraussetzung für das Erreichen einer hohen Probenkapazität ist die Halbautomatisierung des Testablaufs, was für alle Radioimmunoassays mit dem Analmatic System erzielt werden kann. Dabei ist es von Vorteil, daß alle in dieser Arbeit beschriebenen Radioimmuntests nahezu unter den gleichen Testbedingungen optimal ablaufen und die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung universell als Trennmethode benutzt werden kann.

Mit dem Analmatic System ist es möglich, den Alkaloidgehalt von 200 - 300 Proben pro Tag und Person zu bestimmen. Mit den in Tabelle 20 beschriebenen Nachweisverfahren lassen sich maximal 50 Proben pro Tag analysieren, was bspw. für umfangreiche Selektionsuntersuchungen nicht ausreicht.

Bei diesen halbautomatisierten routinemäßig durchgeführten radioimmunologischen Bestimmungen ist die Fehlerbreite von Doppelbestimmungen nur geringfügig höher als die der anderen Nachweisverfahren, wie Tab. 20 zeigt.

Die Präzision der in dieser Arbeit aufgestellten Radioimmuntests ist mit der von anderen Radioimmuntests vergleichbar, wie Tab. 21 zeigt. So besitzt beispielsweise der von Rosenthaler und Munzer (1976) aufgestellte RIA für Dihydroergotamin die gleiche Präzision wie der in dieser Arbeit aufgebaute RIA für Ergotamin.

Um die Ergebnisse von verschiedenen Tests vergleichen zu können und eine Information über die Reproduzierbarkeit des Systems zu erhalten, wurden für jeden RIA Qualitätskontrollen durchgeführt (Rodbard, 1974).

Sie ermöglichen die Abschätzung der Stabilität der Tests und helfen, Fehlerquellen aufzudecken. Für die Qualitätskontrolle werden für jeden Test die U.B.-, $\frac{B}{B_0} = 100\%$ - und $\frac{B}{B_0} = 50\%$ Werte sowie die in jeden Einzeltest eingesetzte Gesamtradioaktivität notiert. Letztere muß konstant bleiben, wenn die anderen Testparameter nicht verändert werden sollen und ist deshalb regelmäßig zu kontrollieren. Ein Anstieg der

Substanz	Variabilität (V%)		Literatur
	innerhalb	zwischen	
	von Tests	Tests	
Nortriptylin	5 - 10	10 - 20	Maguire et al., 1978
Testosteron	8 - 15	16	Wingfield et al., 1975
Deoxycortisol	8 - 11	8 - 18	Schöneshöfer und Harendt, 1977
4-Androsten-3,17 dion	6	14	Parker et al., 1977
Digoxin	5 - 8	14 - 20	Weiler, 1977
Dihydroergotamin	5 - 7	-----	Rosenthaler und Munzer, 1976

Serpentin	5 - 7	15 - 19	diese Arbeit
Raubasin	5 - 7	15 - 19	"
Ajmalin	4 - 6	10 - 14	"
Ergotamin	5 - 7	16 - 21	"
Ergocristin	5 - 7	16 - 21	"
Ergometrin	3 - 5	12 - 16	"
Lysergsäure	3 - 5	-----	"

Tab. 21: Testvariabilitäten innerhalb und zwischen verschiedenen Radioimmunoassays. $V(\%) = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \cdot V$ = Variationskoeffizient, s = Standardabweichung, $\bar{x}$ = Probenmittelwert.

unspezifischen Bindung ist oft ein Hinweis für den einsetzen- den Zerfall des Tracers. Die Tracermenge, die in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden wird ($B/B_0 = 100\%$), ist ein weiteres Stabilitätskriterium. Eine Abnahme dieses Wertes deutet den Zerfall des Tracers oder des Antiserums oder aber nicht optimale Testbedingungen an. Falls alle Parameter konstant bleiben und nur der $B/B_0 = 50\%$ Wert zunimmt, ist ein Teil des Standardantigens zerstört. Es wird mehr Standard- antigen benötigt, um gleiche "Radioaktivitätsmengen" vom Anti- körper zu verdrängen, weshalb die Meßergebnisse fälschlicher- weise erhöht werden. Falls Änderungen der Assay Parameter nicht auf den Zerfall des markierten oder unmarkierten Anti- gens oder des Antikörpers oder auf suboptimale Testbedingungen zurückgeführt werden können, liegen technische (bspw. Pipet- tierfehler der Analmatic) oder manuelle Fehler (bspw. Anset- zen der Testlösungen) vor.

Die Qualitätskontrollen für die in dieser Arbeit beschriebenen Tests zeigten, daß die aufgeführten Parameter bei allen be- schriebenen RIA's über den Zeitraum, in dem die Bestimmungen durchgeführt wurden, stabil waren. Voraussetzung war natür- lich, daß die gleiche Antiserumfraktion und der gleiche Tra- cer (spezifische Aktivität!) benutzt wurden.

Die hohe Spezifität und Sensitivität der beschriebenen Radio- immunoassays erlaubte den Einsatz dieser Tests nicht nur bei Selektionsuntersuchungen und Optimierungen, sondern auch bei anderen phytochemischen Untersuchungen. Der zeitliche Ver- lauf der Alkaloidbildung konnte in C. roseus Pflanzen sowie in parasitischen und saprophytischen Mutterkornkulturen ver- folgt werden (s. Abb. 38 und 46). Weiterhin wurde die Alkaloid- verteilung in C. roseus Pflanzen (s. Abb. 6), verschiedenen R. vomitoria Species (s. Abb. 16) und C. purpurea Sklerotien (s. Abb. 34) radioimmunologisch ermittelt. Diese Untersuchun- gen sind in der gezeigten Genauigkeit mit keiner anderen Ana- lysemmethode erzielbar.

Der Radioimmuntest ist auf Grund seiner hohen Probenkapazität für Selektionsuntersuchungen in der Pflanzenzüchtung bestens geeignet. Mit Hilfe der radioimmunologischen Analyse konnten aus C. roseus Pflanzen verschiedener Herkünfte Hochleistungspflanzen radioimmunologisch selektiert werden. Dabei hatte bereits die 1. Selbstungsgeneration dieser Pflanzen einen durchschnittlich 210% höheren Serpentin- und einen 154% höheren Raubasingehalt als die Elterngeneration (s. Abb. 7). Diese Hochleistungspflanzen können für die Anlage von Gewebekulturen benutzt werden, was Zenk et al. (1977) erfolgreich versucht haben, oder aber als genetisches Ausgangsmaterial für Kreuzungszüchtungen verwendet werden.

Bei der Selektion von parasitischen und saprophytischen C. purpurea Hochleistungsstämmen ist die radioimmunologische Analyse erstmals für die Bestimmung von Pilzinhaltstoffen eingesetzt worden. Aus mehreren tausend C. purpurea Sklerotien konnten innerhalb weniger Monate mehrere Hochleistungsstämme selektiert werden. Mit anderen Bestimmungsmethoden hätte nur ein Bruchteil dieser Sklerotien analysiert werden können (vgl. Békésy, 1956, Eich und Schunack, 1975). Da ein kleines Sklerotiumstück für die radioimmunologische Analyse ausreichte, blieb ein genügend großer Teil des Sklerotiums für die Anlage von saprophytischen Kulturen übrig.

Mit Hilfe von mehr als hundert selektierten alkaloidreichen Sklerotien konnten jedoch keine alkaloidreichen Submerskulturen erzeugt werden, obwohl das Wachstum der mit Hilfe des Myzels dieser Sklerotien angelegten Vor- und Produktionskulturen mit dem von produzierenden Kulturen vergleichbar war und für die Alkaloidbildung erprobte Produktionsmedien benutzt wurden. Das Ausbleiben der Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur ist auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden (vgl. Gröger und John, 1978, Mantle, 1975, Floss, 1976). Der Grund liegt wahrscheinlich darin, daß es noch nicht gelungen ist, die Bedingungen für den Pilz in saprophytischer Kultur zu schaffen, die ihm bei parasitischem

Wachstum die Alkaloidbildung ermöglichen. Da der Pilz während seiner Entwicklung auf dem Roggenfruchtknoten zuerst wie in saprophytischer Kultur alkaloidfreies Myzel bildet (s. Tab. 14), ist anzunehmen, daß das Nährstoffangebot die Alkaloidbildung induziert. Der Pilz vermag in saprophytischer Kultur nicht wie beim parasitischen Wachstum in die sklerotiale Wachstumsphase überzugehen, an die die Alkaloidbildung geknüpft ist (vgl. Mantle, 1974, Esser und Tudzynski, 1978).

Es sind erst wenige Untersuchungen zum Metabolismus von C. purpurea Pflanzen durchgeführt worden (Corbett et al., 1974), wobei die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Nährstoffe, die dem Pilz während seiner parasitischen Entwicklung zur Verfügung stehen, noch nicht ermittelt wurde. Warum einige wenige C. purpurea Stämme in saprophytischer Kultur Alkaloide produzieren, ist unbekannt. Es könnte sich jedoch um mutierte Stämme oder besondere Rassen handeln, die auch bei einem anderen Nährstoffangebot als bei parasitischem Wachstum zur Alkaloidbildung in saprophytischer Kultur befähigt sind.

Auch ein Screening auf alkaloidreiche Myzelisolate des C. purpurea Produktionsstammes 202 führte nicht zur Selektion von Hochleistungsstämmen. Diese Methode bietet sich aber dennoch für ähnliche Untersuchungen an anderen Pilzstämmen an, da innerhalb einer Woche mehrere hundert Kulturen auf Grund der außerordentlichen Sensitivität und Probenkapazität des Radioimmuntests analysiert werden können, was mit keinem anderen Nachweisverfahren möglich ist.

Eine auf einem ähnlichen Prinzip beruhende Selektionsmethode haben schon Zenk et al. (1977) mit der radioimmunologischen Selektion von alkaloidreichen C. roseus Zellkolonien vorgestellt, durch die es gelang, C. roseus Gewebekulturhochleistungsstämme zu gewinnen.

Es kann in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, daß der RIA allen anderen Bestimmungsmethoden bezüglich Nachweisempfindlichkeit, Arbeitsaufwand und Größe der Probenserien nicht nur bei Selektionsuntersuchungen, sondern auch bei der Optimierung von pflanzlichen Gewebe- und saprophytischen Pilzkulturen überlegen ist. Nachdem 1977 (Zenk et al.) erstmals die radioimmunologische Optimierung einer pflanzlichen Gewebekultur (C. roseus) beschrieben worden ist, kann mit der Optimierung einer R. vomitoria Gewebekultur ein weiteres Beispiel für die Anwendbarkeit des RIA's auf diesem Gebiet gezeigt werden. Am Beispiel des C. purpurea Stammes 202 wird erstmals die radioimmunologische Optimierung einer saprophytischen Pilzkultur demonstriert.

Auf Grund der hohen Sensitivität und Spezifität der Radioimmuntests konnten die Alkaloide aus pflanzlichen Gewebekultur- und Myzelextrakten sowie Kulturfiltraten ohne vorherige Reinigung oder Konzentrierung der Lösungen direkt bestimmt werden und selbst wenige µg der zu messenden Substanz in einer 50 ml Kultur reichten für eine quantitative Bestimmung aus. Bei herkömmlichen Alkaloidbestimmungen von C. purpurea Myzelextrakten und Kulturfiltraten müssen die Alkaloide extrahiert und konzentriert sowie chromatographisch getrennt werden, was die Probenkapazität stark limitiert (KobeI et al., 1962, Amici et al., 1969, Arcamone et al., 1970).

Die gezeigten Beispiele dürften veranschaulicht haben, daß der RIA generell für Verteilungsuntersuchungen sowie für die Selektion von Hochleistungsstämmen und Optimierungen von pflanzlichen Gewebe- und saprophytischen Pilzkulturen geeignet ist. Da für fast alle Pflanzeninhaltsstoffe Radioimmuntests aufgestellt werden können, sind weitere Beispiele für die Anwendbarkeit dieses Nachweisverfahrens auf den in dieser Arbeit beschriebenen Gebieten zu erwarten.

Darüber hinaus dürfte diese hochempfindliche Analysenmethode auch neuere Erkenntnisse auf anderen phytochemischen Gebieten ermöglichen, die bislang mangels eines geeigneten Nachweisverfahrens nicht erforscht werden konnten.

V. Zusammenfassung

- I. In dieser Arbeit werden der Aufbau von Radioimmunoassays für Indolalkaloide (Ajmalin, Ergotamin, Ergocristin, Ergometrin und Lysergsäure) und Anwendungsmöglichkeiten für diese und für den Raubasin und Serpentin RIA beschrieben. Dabei kann unter anderem gezeigt werden, daß diese Indolalkaloid RIA's für Alkaloidverteilungsmessungen in Catharanthus und Rauwolfia Pflanzen und C. purpurea Sklerotien ebenso wie für die Selektion von Hochleistungstämmen und für die Optimierung von pflanzlichen Gewebe- und saprophytischen Pilzkulturen bestens geeignet sind.
- II. Für die Kopplung der entsprechenden Indolalkaloide an Bovinserumalbumin werden drei verschiedene Methoden benutzt: 1. die Mannich Reaktion (alle Ergotalkaloide), 2. die Reaktion über das gemischte Anhydrid (Lysergsäure), 3. die Carbodiimid Reaktion (Ajmalin). Mit diesen Immuno- genen sind in Kaninchen jeweils mit der gleichen Immunisierungstechnik Antikörper erzeugt worden, die die erhoffte Affinität zu den Antigenen besitzen (die Affinitätskonstanten liegen zwischen $0,15 \cdot 10^9 \frac{1}{\text{Mol}}$ und $3,76 \cdot 10^9 \frac{1}{\text{Mol}}$) und brauchbare Titer aufweisen (die Antiserumendverdünnungen liegen bei den aufgestellten RIA's zwischen 1 : 200 und 1 : 1400). Die Kreuzreaktionen gegen verwandte Indolalkaloide zeigen, daß alle Antikörper, die für die Erstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Radioimmunoassays benutzt wurden, die gewünschte Spezifität besitzen.
- Deshalb können alle Indolalkaloide mit den entsprechenden Radioimmuntests aus ungereinigten Extrakten und Filtraten bestimmt werden. Die Richtigkeit der radioimmunologischen Bestimmungen ist durch die enge Korrelation mit dem fluorimetrischen Nachweisverfahren bewiesen worden.
- III. Für die Erstellung des Lysergsäure RIA's wurden tritierte und jodierte Lysergsäure synthetisiert. ^3H Lysergsäure wurde durch die Hydrolyse von ^3H Ergotamin (Amersham-

Buchler) gewonnen. Für die Synthese des ^{125}J Tracers wurde ein jodierbares Derivat (Tyramin-Lysergsäure) hergestellt, das über die Chloramin-T Methode jodiert wurde. Die mit den beiden Tracern aufgestellten Tests sind hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität vergleichbar.

- IV. Alle Ergotalkaloid RIA's benötigen die gleichen Bedingungen für eine optimale Antigen-Antikörperreaktion und Fällung der Antigen-Antikörperkomplexe. Für einen optimalen Ablauf des Ajmalin RIA's muß die Rinderserum- und Ammoniumsulfatkonzentration leicht variiert werden. Bei allen Tests erweist sich die Ammoniumsulfatfällung als geeignete Trennmethode.
- V. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Radioimmuntests erfüllen die Forderung der hohen Sensitivität. Die Meßbereiche aller Standardkurven liegen im unteren Nanogramm-Bereich. Die Empfindlichkeit der Tests kann durch die Verringerung der markierten Antigen- und Antikörpermenge im Testansatz zusätzlich gesteigert werden.
- VI. Die Spezifität, die Sensitivität und der Titer der Antiserumfraktionen sind von der Immunisierungszeit (von der Anzahl der Boosterinjektionen und von der Konstitution der Tiere) und vom Genotyp des Kaninchens abhängig. Es läßt sich keine systematische Zu- oder Abnahme der charakteristischen Antiserumparameter erkennen. Aus den Antiserumfraktionen verschiedener Tiere können solche mit besonders hoher Spezifität und hohem Titer ermittelt werden.
- VII. Mit Hilfe der Radioimmunoassays kann die Alkaloidverteilung in C. roseus, R. vomitoria, R. tetraphylla und R. verticillata Pflanzen bestimmt werden. Bei diesen Pflanzenarten lassen sich die größten Alkaloidmengen in der Wurzelrinde lokalisieren, während die grünen Pflanzenteile nur Spuren der entsprechenden Alkaloide besitzen. Da die

Alkaloidverteilung in den Wurzeln der beschriebenen Pflanzenarten ungleichmäßig ist, müssen für eine quantitative Bestimmung des Alkaloidgehaltes die ganzen Wurzeln als repräsentative Proben entnommen werden. Mit Hilfe der radioimmunologischen Bestimmung können aus C. roseus Pflanzen verschiedener Herkünfte Hochleistungsstämme selektiert und Rauwolfia vomitoria Gewebekulturen optimiert werden.

- VIII. Die radioimmunologische Bestimmung der Alkaloid Längs- und Querverteilung in C. purpurea Sklerotien zeigt, daß Ergotamin und Ergocristin relativ gleichmäßig im Mutterkorn verteilt sind. Deshalb erlaubt die Alkaloidbestimmung eines Sklerotiumstückes (ca. 20 mg) eine Aussage über den Alkaloidgehalt des ganzen Sklerotiums. Mit Hilfe von radioimmunologisch selektierten Sklerotien werden parasitische und saprophytische Mutterkornkulturen angelegt. In keiner der mehr als 300 C. purpurea Submerskulturen sind mehr als 0,5 mg Alkaloide pro 1 Medium nachgewiesen worden.

Die parasitischen Kulturen werden durch Infektion von Roggenpflanzen im Freiland oder in der Klimakammer (unabhängig von der Jahreszeit) angezogen. Es erweist sich als günstig, fünf Blüten im unteren Ährendrittel zu infizieren. Die Alkaloidbildung in diesen Mutterkornkulturen ist nach etwa 36 Tagen abgeschlossen.

Die Analyse der Sklerotien der 1. Nachkommengenerationen von selektierten Sklerotien bringt folgende Ergebnisse:

1. durch radioimmunologische Selektion können parasitische Hochleistungsstämme selektiert werden,
2. der Alkaloidgehalt des Hochleistungsstammes 1065 kann durch weitere Selektion nicht wesentlich gesteigert werden,
3. durch Infektion von Roggenpflanzen mit C. purpurea Sporen verschiedener chemischer Rassen gelingt es, Sklerotien mit neuem Alkaloidspektrum zu erzeugen. Mit Hilfe von Einsporenkulturen können die verschiedenen chemischen Rassen aus dem Sklerotium wieder isoliert werden.

IX. Die Optimierung der saprophytischen Kultivierung des C. purpurea Stammes 202 wird ebenfalls radioimmunologisch durchgeführt. Die Ergometrin- und Ergocristinbildung der Kultur ist von vielen Faktoren abhängig. Eine optimale Alkaloidbildung in Submerskulturen des Stammes 202 wird nur erzielt, wenn für die Anlage der Vor- und der Produktionskulturen undifferenziertes Myzel benutzt wird. Die Produktionskulturen müssen für eine optimale Alkaloidbildung bei 25°C im Schikanekolben angezogen werden.

Weiterhin ist die Alkaloidproduktion sehr vom Medium und den Konzentrationen der Medienkomponenten abhängig. In einigen Produktionsmedien produziert der Pilz bei gleichem Wachstum ca. 500-fach höhere Alkaloidmengen als in anderen. Die Alkaloidbildung kann nicht durch biosynthetische Vorstufen wie Tryptophan, Prolin und Phenylalanin, dafür aber durch osmotisch wirksame Substanzen wie NaCl und Sorbit gesteigert werden.

X. Myzelisolate des Stammes 202 zeigen große Unterschiede im Alkaloidgehalt (> Faktor 20), der aber modifikatorisch bedingt ist. Deshalb gelingt es auch nicht, den durchschnittlichen Alkaloidgehalt der Myzelisolate durch weitere Selektion zu steigern und aus selektierten Myzelisolaten Submerskulturen mit erhöhter Alkaloidproduktion anzulegen.

Durch parasitische Kultur des Stammes 202 können Sklerotien gewonnen werden. Alle Submerskulturen, die mit Hilfe dieser Sklerotien angelegt wurden, produzieren Alkaloide, teilweise in höherer Konzentration als die Ausgangskultur.

VI. Literaturverzeichnis

=====

- AGURELL, S.: Costaclavine from *Penicillium chermesinum*.
Experientia 20 (1964) 25 - 26.
- AGURELL, S., RAMSTAD, E.: Biogenetic Interrelationships of
Ergot Alkaloids. *Tetrahedron Letters* 1961 501 - 505.
- AMICI, A.M., MINGHETTI, A., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L.:
Production of Peptide Ergot Alkaloids in Submerged
Culture by Three Isolates of *Claviceps purpurea*.
Appl. Microbiol. 18 (1969) 464 - 468.
- AMICI, A.M., MINGHETTI, A., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L.:
Ergotamine Production in Submerged Culture and Phy-
siology of *Claviceps purpurea*. *Appl. Microbiol.*
15 (1967) 597 - 602.
- AMICI, A.M., MINGHETTI, A., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L.:
Production of Ergotamine by a Strain of *Claviceps*
purpurea (Fr.) Tul. *Experientia* 22 (1966) 415 - 416.
- AMICI, A.M., MINGHETTI, A., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L.:
Fermentative Process for Producing Ergocryptine.
Amerikanisches Patent Nr. 3485722, 1969.
- AMICI, A.M., MINGHETTI, A., SPALLA, C.:
Mikrobiologisches Verfahren zur gleichzeitigen Herstel-
lung von Ergocornin und Ergosin. Deutsche Auslege-
schrift Nr. 1909216, 1974.
- AMICI, A.M., SCOTTI, T., SPALLA, C., TOGNOLI, L.:
Heterokaryosis and Alkaloid Production in *Claviceps*
purpurea. *Appl. Microbiol.* 15 (1967) 611 - 615.
- AMICI, A.M., SPALLA, C., SCOTTI, T., MINGHETTI, A.:
Verfahren zur biosynthetischen Herstellung einer
Mischung von Ergotamin und Ergotaminin in Submers-
züchtung unter aeroben Bedingungen. Deutsche Aus-
legeschrift Nr. 1210128, 1966.
- ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., FERNI, G., PENCO, S., PENNELLA,
P., POL, C.: Ergotamine Production and Metabolism of
Claviceps purpurea Strain 275 FI in Stirred Fermen-
ters. *Can. J. Microbiol.* 16 (1970) 923 - 931.
- ARCAMONE, F., CHAIN, E.B., FERRETTI, A., MINGHETTI, A.,
PENNELLA, P., TONOLO, A., VERO, I.: Production of
a New Lysergic Acid Derivative in Submerged Culture
by a Strain of *Claviceps paspali* Stevens and Hall.
Proceedings of the Royal Society, Series B 155
(1961) 26 - 54.
- ARENS, H.: Aufstellung und Anwendung eines Radioimmunoassays
für Serpentin und Raubasin. Diplomarbeit, Bochum 1976.

- ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassays for the Determination of the Indole Alkaloids Ajmalicine and Serpentine in Plants. *Planta medica* 34 (1978) 37 - 46.
- ASHBY, C.D., LEWIS, J.E., NELSON, J.C.: Measurement of Three Aminoglycoside Antibiotics with a Single Radioimmunoassay System. *Clin. Chem.* 24 (1978) 1734 - 1737.
- BÉKÉSY, N.: Über die vegetative und generative Übertragung von Mutterkorneigenschaften. *Z. Pflanzenzüchtung* 35 (1956) 461 - 496.
- BÉKÉSY, N.: Verfahren und Einrichtung zur Ansteckung von Pflanzen für industrielle und landwirtschaftliche Zwecke durch mechanischen Eingriff. Ungarisches Patent Nr. 112741, 1934.
- BÉKÉSY, N.v.: Über parasitische Mutterkornkulturversuche. *Zbl. f. Bakt. u. Parasitenk. II Abt.* 99 (1938) 321 - 332.
- BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Recent Studies on Insulin-Binding Antibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 82 (1959) 338 - 344.
- BISSEL, D.M., TILLES, J.G.: Radioimmunoassay of Serum Albumin Produced by Human Embryonic Liver in Monolayer Culture. *J. Cell Biol.* 53 (1972) 819 - 823.
- BITE, P., PONGRACZ-STERK, L., DISZLER, E.: Herstellungen von Ajmalinderivaten I., *Magyar Kémiai Folyóirat* 69 (1963) 84 - 87.
- BLAYDES, D.F.: Interaction of Kinetin and Various Inhibitors in the Growth of Soybean Tissue. *Physiol. Plantarum* 19 (1966) 748 - 753.
- BOLTON, A.E., HUNTER, W.M.: The Labelling of Proteins to High Specific Activities by Conjugation to a ^{125}J -Containing Acylating Agent. *Biochem. J.* 133 (1973) 529 - 539.
- BU'LOCK, J.D.: Secondary Metabolism in Fungi and its Relationships to Growth and Development. In: *The Filamentous Fungi. Vol. 1: Industrial Mycology.* Smith, J.E., Berry, D.R. (eds.). London 1974. pp. 33-58.
- BU'LOCK, J.D., BARR, J.G.: A Regulation Mechanism Linking Tryptophan Uptake and Synthesis with Ergot Alkaloid Synthesis in *Claviceps*. *Lloydia* 31 (1968) 342 - 354.
- CAREW, D.P.: Tissue Culture Studies of *Catharanthus roseus*. In: *The Catharanthus Alkaloids.* Taylor, W.I., Farnsworth, N.R. (eds.). New York 1975. pp. 193 - 208.
- CARLIN, R.B., MOORES, M.S.: Evidence of a 1,4-Methyl Migration During a Fischer Reaction. *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959) 1259.
- CENTENO, E.R., JOHNSON, W.J., SEHON, A.H.: Antibodies to Two Common Pesticides, DDT and Malathion. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 37 (1970) 1 - 13.

- CHAIN, E.B., TONOLO, A., BONINO, C.: Verfahren zur biosynthetischen Herstellung von Lysergsäurealkaloiden. Schweizerisches Patent Nr. 394227, 1965.
- CHAO, J.-M., DER MARDEROSIAN, A.H.: Identification of Ergoline Alkaloids in the Genus *Argyrea* and Related Genera and their Chemotaxonomic Implications in the *Convolvulaceae*. *Phytochemistry* 12 (1973) 2435 - 2440.
- CONRAD, D.H., WIRTZ, G.H.: Radioimmunoassay for Vitamin A. *Fed. Proc.* 31 (1972) 2650.
- COOK, B.: Automation and Data Processing for Radioimmunoassays. In: *Steroid Immunoassay*. Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds.). Cardiff 1975. pp. 133 - 140.
- CORBETT, K., DICKERSON, A.G., MANTLE, P.G.: Metabolic Studies on *Claviceps purpurea* during Parasitic Development on Rye. *J. of General Microbiology* 84 (1974) 39 - 58.
- DAWSON, E.C., DENNISSEN, E.H.C., VAN WEEMEN, B.K.: A Simple and Efficient Method for Raising Steroid Antibodies in Rabbits. *Steroids* 31 (1978) 357 - 366.
- DEN HOLLANDER, F.C., VAN WEEMEN, B.K., WOODS, G.F.: Specificities of Antisera Against Estrogens Linked to Albumin at Different Positions. *Steroids* 23 (1974) 549 - 560.
- DESBUQUOIS, B., AURBACH, G.D.: Use of Polyethylene Glycol to Separate Free and Antibody - Bound Peptide Hormones in Radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol. + Metab.* 33 (1971) 732 - 738.
- DIEL, F., SCHNEIDER, E., QUABBE, H.J.: Development of a Radioimmunoassay for Cyclic Somatostatin: Antibody Production, Comparative Radioiodination, and Dose-Response Curve. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15 (1977) 669 - 677.
- EICH, E., SCHUNACK, W.: Die direkte Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch Remissions- und Fluoreszenzmessungen. *Planta medica* 27 (1975) 58 - 64.
- ERLANGER, B.F.: Principles and Methods for the Preparation of Drug Protein Conjugates for Immunological Studies. *Pharmacol. Rev.* 25 (1973) 271 - 280.
- ERLANGER, B.F., BOREK, F., BEISER, S.M., LIEBERMANN, S.: Steroid-Protein Conjugates. 1. Preparation and Characterization of Conjugates of Bovin Serum Albumin with Testosterone and with Cortisone. *J. Biol. Chem.* 228 (1957) 713 - 727.
- ESSER, K., TUDZYNSKI, P.: Genetics of the Ergot Fungus *Claviceps purpurea*. I. Proof of a Monoecious Life Cycle and Segregation Patterns for Mycelial Morphology and Alkaloid Production. *Theor. Appl. Genet.* 53 (1978) 145 - 149.

- EXLEY, D., JOHNSON, M.W., DEAN, P.D.G.: Antiserums Highly Specific for 17 β -Estradiol. *Steroids* 18 (1971) 605 - 620.
- FARNSWORTH, N.R.: Importance of Secondary Plant Constituents as Drugs. In: *Phytochemistry Vol. III*. Müller, L.P. (ed.) New York 1973. pp. 351 - 380.
- FAULSTICH, H., TRISCHMANN, H., ZOBEL, S.: A Radioimmunoassay for Amanitin. *FEBS Letters* 56 (1975) 312 - 315.
- FLOSS, H.G.: Biosynthesis of Ergot Alkaloids and Related Compounds. *Tetrahedron* 32 (1976) 873 - 912.
- FLOSS, H.G., HORNEMANN, U., SCHILLING, N., GRÖGER, D., ERGE, D.: Chanoclavines and the Biosynthesis of Ergot Alkaloids. *Chem. Comm.* 1967 105 - 106.
- FLOSS, H.G., GÜNTHER, H., GRÖGER, D., ERGE, D.: Biosynthese der Mutterkornalkaloide. Biogenetische Beziehungen zwischen Clavinen und Lysergsäure-Derivaten. *Z. Naturforsch.* 21b (1966) 128 - 131.
- FLOSS, H.G., MÖTHES, U.: Über den Einfluß von Tryptophan und analogen Verbindungen auf die Biosynthese von Clavinalkaloiden in saprophytischer Kultur. *Archiv für Mikrobiologie* 48 (1964) 213 - 221.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirement of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exptl. Cell Res.* 50 (1968) 151 - 158.
- GEORGIAN, V.: Protomorphinoid Syntheses. *Chem. Ind. (London)* 1957 1124 - 1125.
- GIBBS, D.R.: IN: *Chemotaxonomy of Flowering Plants*. Montreal-London: McGill-Queen's Univ. 1974, Vol. I, p. 214.
- GÖRÖG, S., HERÉNYI, B., JOVÁNOVICS, K.: High-Performance Liquid Chromatography of Catharanthus Alkaloids. *J. Chromatogr.* 139 (1977) 203 - 206.
- GREENWOOD, B.F., HUNTER, W.M., GLOVER, I.S.: The Preparation of ¹³¹I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity. *Biochem. J.* 89 (1963) 114 - 123.
- GRÖGER, D., ERGE, D.: Zur Biosynthese der Peptidalkaloide von *Claviceps purpurea*. *Z. Naturforsch.* 25b (1970) 196 - 199.
- GRÖGER, D., JOHNE, S.: Mutterkorn-Quelle vielfältiger Arzneistoffe. *Wissenschaft und Fortschritt* 28 (1978) 95 - 99.
- GYAR, G.V.: Preparation of Ergot Alkaloids. *Englisches Patent* Nr. 1064764, 1967.
- HAINES, C.F., MAHAJAN, D.K., MILKOVIC, D., MILKOVIC, M., VESELL, E.S.: Radioimmunoassay of Plasma Nicotine in Habituated and Naive Smokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 16 (1974) 1083 - 1089.
- HERBERT, V.: Coated Charcoal Separation of Free Labelled Hormone from Bound to Antibody. In: *Protein and Polypeptide Hormones*. Int. Symp. Liège, 19.-25.5.1968. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam 1968. pp. 55 - 60.

- HOFMANN, A.: Die Mutterkornalkaloide. Stuttgart, 1964.
- HOFMANN, A., TSCHERTER, H.: Isolation of Lysergic Acid Alkaloid from the Mexican Magic Drug Ololuiqui (*Rivea Corymbosa*). *Experientia* 16 (1960) 414.
- HUNTER, W.M., NARS, P.W., RUTHERFORD, F.J.: Preparation and Behaviour of ^{125}J Labelled Radioligands for Phenolic and Neutral Steroids. In: Steroid Immunoassay. Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds.). Cardiff 1975. pp. 141 - 152.
- HURN, B.A.L., LONDON, J.: Antisera for Radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay Methods. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds.). London 1971. pp. 112 - 142.
- JEFFCOATE, S.L., EDWARDS, R., GILBY, E.D., WHITE, N.: The Use of (^3H)-Labelled Ligands in Steroid Radioimmunoassays. In: Steroid Immunoassay. Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds.). Cardiff 1975. pp. 133 - 140.
- IWU, M.M., COURT, W.E.: Root Alkaloids of *Rauwolfia vomitoria* Afz.. *Planta medica* 32 (1977) 89 - 99.
- JAKOVljević, J.M., SEAY, L.D., SHAFFER, R.W.: Assay Methods for Some *Vinca rosea* Alkaloids. *J. Pharm. Sci.* 53 (1964) 553 - 557.
- JOHNSTON, J.R.: Strain Improvement and Strain Stability in Filamentous Fungi. In: The Filamentous Fungi. Vol.1: Industrial Mycology. Smith, J.E., Berry, D.R. (eds.). London 1974, pp. 59 - 78.
- JUNG, M., ROCHELMMEYER, H.: Zur Morphologie und Cytologie von *Claviceps purpurea* (Tulasne) in saprophytischer Kultur. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 35 (1960) 343 - 378.
- KÄHLER, H.J.: Über neue *Rauwolfia* Alkaloide mit hypotensiver Wirkung beim Phaeochromocytom. *Med. Klin.* 53 (1958) 423 - 427.
- KÄHLER, H.J.: *Rauwolfia* Alkaloide. Mannheim, 1970.
- KEIPERT, S., VOIGT, R.: Quantitative Dünnschichtchromatographie von Mutterkornalkaloiden. *J. Chromatogr.* 64 (1972) 327 - 340.
- KELLEHER, W.J.: Ergot Alkaloid Fermentations. *Advances in Applied Microbiology* 11 (1969) 211 - 244.
- KHORANA, H.G.: Observations on the Use of Dicyclohexylcarbodiimide in the Synthesis of Peptides. *Chem. Ind. (London)* 1955 1087 - 1088.
- KIRCHHOEFER, R.D.: Semiautomated Analyses of Some Ergot Alkaloid Formulations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61 (1978) 1520 - 1522.
- KITAGAWA, T., FUJITAKE, T., TANIYAMA, H., AIKAWA, T.: Enzyme Immunoassay of Viomycin. *J. Biochem.* 83 (1978) 1493 - 1501.

- KLEINSORGE, H.: Klinische Untersuchungen über die Wirkungsweise des Rauwolfia Alkaloids bei Herzrhythmusstörungen, insbesondere der Extrasystolie. Med. Klin. 54 (1959) 409 - 416.
- KOBEL, H., BRUNNER, R., BRACK, A.: Vergleich der Alkaloidbildung von *Claviceps purpurea* in parasitischer und saprophytischer Kultur. *Experientia* 18 (1962) 140 - 141.
- KOBEL, H., SCHREIER, E., RUTSCHMANN, J.: 6-Methyl-^{8,9}-ergolen-8-carbonsäure, ein neues Ergolinderivat aus Kulturen eines Stammes von *Claviceps paspali* Stevens et Hall. *Helv. Chim. Acta* 47 (1964) 1052 - 1064.
- KOHEN, F., BAUMINGER, S., LINDNER, H.R.: Preparation of Antigenic Steroid-Protein Conjugates. In: Steroid Immunoassay. Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds.). Cardiff 1975. pp. 11 - 32.
- KOST, A.N., YUDIN, L.G., CHOU, C.Y.: -Ketonitriles in the Fischer Reaction. *J. Gen. Chem. USSR* 34 (1964) 3487 - 3491.
- KUSS, E., GOEBEL, R.: Determination of Estrogens by Radioimmunoassay with Antibodies to Estrogen G6-Conjugates. II. Synthesis of 17 -Estradiol-6-Albumin Conjugate. *Steroids* 19 (1972) 737 - 740.
- KYBAL, J., PROTIVA, J., STRNADOVA, K., STARY, F.: Verfahren zur biosynthetischen Herstellung von Mutterkornalkaloiden durch Züchtung von Mutterkornpilzen der Gattung *Claviceps purpurea* Tul.. Deutsche Auslegeschrift Nr. 1201949, 1965.
- LADER, S., HURN, B.A.L., COURT, G.: A Comparative Assessment of Immunization Procedures for Radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, edited by International Atomic Energy Agency, Vol. I. New York 1974. pp. 31 - 44.
- LANDON, J., MOFFAT, A.C.: The Radioimmunoassay of Drugs. *The Analyst* 101 (1976) 225 - 243
- LANDSTEINER, K.: The Specificity of Serological Reactions. Dover Press, New York, 1945.
- LESNE, M., DOLPHEN, R.: Development of a Radioimmunoassay for Aprindine. *J. of Immunological Methods* 17 (1977) 189 - 198.
- LEUTE, R., ULLMAN, E.F., GOLDSTEIN, A.: Spin Immunoassay of Opiate Narcotics in Urine and Saliva. *Jama* 221 (1972) 1231 - 1234.
- LEVY, A., KAWASHIMA, K., SPECTOR, S.: Radioimmunoassay for Reserpine. *Life Sciences* 19 (1976) 1421 - 1430.
- LIN, C.C.L., BLAIR, G.E., CASSADY, J.M., GRÖGER, D., MAIER, W., FLOSS, H.G.: Biosynthesis of Ergot Alkaloids. Synthesis of 6-Methyl-8-acetoxymethylene-9-ergolene and its Incorporation into Ergotoxine by *Claviceps*. *J. Org. Chem.* 38 (1973) 2249 - 2252.

- LINDNER, H.R., PEREL, E., FRIEDLANDER, A., ZEITLIN, A.: Specificity of Antibodies to Ovarian Hormones in Relation to the Site of Attachment of the Steroid Hapten to the Peptide Carrier. *Steroids* 19 (1972) 357 - 375.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plantarum* 18 (1965) 100 - 127.
- LOS, C.W., COURT, W.E.: Estimation of the Alkaloids of *Rauwolfia caffra* by Quantitative Thin-Layer Chromatography. *Planta medica* 17 (1969) 164 - 169.
- MAGUIRE, K.P., BURROWS, G.D., NORMAN, T.R., SCOGGINS, B.A.: A Radioimmunoassay for Nortriptyline (and Other Tricyclic Antidepressants) in Plasma. *Clin. Chem.* 24 (1978) 549 - 554.
- MANTLE, P.G.: Industrial Exploitation of Ergot Fungi. In: *The Filamentous Fungi. Vol. 1: Industrial Mycology.* Smith, J.E., Berry, D.R. (eds.). London 1974. pp. 281 - 300.
- MANTLE, P.G.: Industrial Exploitation of Ergot Fungi. *Filamentous Fungi* 1 (1975) 281 - 300.
- MARCHALONIS, J.J.: An Enzymatic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulin and other Proteins. *Biochem. J.* 113 (1969) 299 - 305.
- MARSHALL, J.C., ODELL, W.D.: Preparation of Biologically Active Iodine-¹²⁵I-Labelled LH-RH Suitable for Membrane-Binding Studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149 (1975) 351 - 355.
- MARTIN, J.F., DEMAINE, A.L.: Fungal Development and Metabolite Formation. In: *The Filamentous Fungi. Vol. 3: Developmental Mycology.* Smith, J.E., Berry, D.R. (eds.). London 1978. pp. 426 - 450.
- MILES, L.E.M., BIEBER, C.P., ENG, L.F.: Properties of Two-Site-Immuno-Radiometric (Labelled Antibody) Assay Systems. In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, edited by International Atomic Energy Agency, Vol. 1. New York 1974. pp. 31 - 44.
- MORRIS, B.J.: Specific Radioactivity of Radioimmunoassay Tracer Determined by Self-Displacement: A Re-Evaluation. *Clinica Chimica Acta* 73 (1976) 213 - 216.
- NARS, P.W., HUNTER, W.M.: A Method for Labelling Oestradiol-^{17β} with Radioiodine for Radioimmunoassays. *J. Endocrin.* 57 (1973) XLVII - XLVIII.
- NIESCHLAG, E., KLEY, K.H., URADEL, K.H.: Production of Steroid Antisera in Rabbits. In: *Steroid Immunoassay.* Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K. (eds.). Cardiff 1975. pp. 87 - 96.
- NITSCH, J.P., NITSCH, C.: Haploid Plants from Pollen Grains. *Science* 163 (1969) 85 - 87.
- ODELL, W.D., ROSS, G.T., RAYFORD, P.L.: Radioimmunoassay for Human Luteinizing Hormone. *Metab. Clin. Exptl.* 15 (1966) 287 - 289.

- ODELL, W.D., SKOWSKY, R., ABRAHAM, G., HESCOX, M., FISHER, D., GROVER, P.K.: Production of Antisera for Polypeptide and Steroid Radioimmunoassays. *Biology of Reproduction* 6 (1972) 427 - 442.
- ODELL, W.D., WILBER, J.F., PAUL, W.E.: Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human Serum. *J. Clin. Endocrinol. + Metab.* 25 (1965) 1179 - 1188.
- OLIVER, G.C., PARKER, B.M., BRASFIELD, D.L., PARKER, C.W.: The Measurement of Digitoxin in Human Serum by Radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* 47 (1968) 1035 - 1042.
- PARKER, L.N., GROVER, P.K., ODELL, W.D.: An Improved Radioimmunoassay for 4-Androstene-3,17-Dione. *Steroids* 29 (1977) 715 - 724.
- PAZOUTOVA, S., REHACEK, Z., POKORNY, V.: Microcycle Sporulation in the *Claviceps purpurea* 244. *Folia Microbiol.* 23 (1978) 376 - 378.
- RIESEN, W.F., MUACEVIC, B., JAGGI, M.: Radioimmunoassay and Automated Enzyme Immunoassay for the Determination of Thyroxine. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16 (1978) 387 - 389.
- RODBARD, D.: Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. *Clin. Chem.* 20 (1974) 1255 - 1270.
- ROSENTHALER, J., MUNZER, H.: 9,10-Dihydroergotamine: Production of Antibodies and Radioimmunoassay. *Experientia* 32 (1976) 234 - 236.
- ROTHLIN, E.: Analyses of the Blood-Pressure Action of the Natural and the Dihydrogenated Ergot Alkaloids. *Experientia* 5 (1949) 78 - 79.
- RUTSCHMANN, J., KOBEL, H.: Microbiological Production of Lysergic Acid Derivatives. U.S. Patent Nr. 3219545, 1965.
- SCATCHARD, G.: The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660 - 672.
- SCHILLER, H.S., KULCHINSKI, L., LUTHY, D.A.: Radioimmunoassay of Alpha-Fetoprotein, with Special Reference to Iodination and Purification Techniques. *Clin. Chem.* 24 (1978) 275 - 279.
- SCHÖNESHÖFER, M., HARENDT, H.: Simultaneous Radioimmunoassay for Corticosterone and Deoxycortisol in Human Serum. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15 (1977) 69 - 75.
- SHEEHAN, J.C., HESS, G.P.: A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 1067 - 1068.
- SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA: Ergotamine and Ergocryptine. *Englisches Patent* Nr. 1158380, 1969.
- SONNENBERG, A., LILIENFELD-TOAL, H.: Improvement of the Radioimmunological Standard Curve for Steroid Assay Using Ammonium Sulphate. *Clinica Chimica Acta* 70 (1976) 191 - 195.

- SORS, H., MACLOUF, J., PRADELIES, P., DRAY, F.: The Use of Iodinated Tracers for a Sensitive Radioimmunoassay of 13,14-Dihydro-15-Ketoprostaglandin F.
Biochimica et Biophysica Acta 486 (1977) 553 - 564.
- SPILSBURY, J.F., WILKINSON, S.: The Isolation of Festuclavine and Two New Clavine Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* Fres. *J. Chem. Soc.* 1961 2085 - 2091.
- STAHL, E., KALDEWEY, H.: Trace Analysis of Physiologically Active, Simple Indole Derivatives. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 323 (1961) 183 - 191.
- STAUFFACHER, D., TSCHERTER, H., HOFMAN, A.: Isolierung von Ergosin und Ergosinin neben Agroclavin aus den Samen von *Ipomoea argyrophylla* Vatke (Convolvulaceae). *Helv. Chim. Acta* 48 (1965) 1379 - 1380.
- STEINER, M., SPRATT, J.L.: Solid-Phase Radioimmunoassay for Morphine, with Use of an Affinity-Purified Morphine Antibody. *Clin. Chem.* 24 (1978) 339 - 342.
- STÖCKIGT, J., HUSSON, H.P., KAN-FAN, C., ZENK, M.H.: Cathenamine, a Central Intermediate in the Cell Free Biosynthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids. *J.C.S. Chem. Comm.* 1977 164 - 166.
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Strictosidine (Isovincoiside): the Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids. *J.C.S. Chem. Comm.* 1977 646 - 648.
- SZEPESI, L., FEHER, J., SZEPESI, G., GAZDAG, M.: High - Performance Liquid Chromatography of Ergot Alkaloids. *J. Chromatogr.* 149 (1978) 271 - 280.
- SZEPESI, G., GAZDAG, M.: Determination of Dihydroergotoxine Alkaloids by Gas-Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 122 (1976) 479 - 485.
- SZEPESI, G., MOLNAR, J., NYIREDY, S.: Separation and Determination of Ergotoxine and Dihydroergotoxine Alkaloids by a TLC Method. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 294 (1979) 47 - 48.
- TABER, W.A., VINING, L.C.: The Influence of Certain Factors on the in Vitro Production of Ergot Alkaloids by *Claviceps Purpurea* (Fr.) Tul. *Can. J. Microbiol.* 4 (1958) 611 - 626.
- TABER, W.A., VINING, L.C., HEACOCK, R.A.: Clavine and Lysergic Acid Alkaloids in Varieties of Morning Glory. *Phytochemistry* 2 (1963) 65 - 70.
- TEALE, J.D., CLOUGH, J.M., MARKS, V.: Radioimmunoassay of Vinblastine and Vincristine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 4 (1977) 169 - 172.
- THÉRIAULT, L., PAGE, M.: A Solid-Phase Enzyme Immunoassay for Serum Ferritin. *Clin. Chem.* 23 (1977) 2142 - 2144.
- TONOLO, A.: Production of Peptide Alkaloids in Submerged Culture by a Strain of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. *Nature (London)* 209 (1966) 1134.

- TREIMER, J., ZENK, M.H.: Enzymic Synthesis of Corynanthe-Type Alkaloids in Cell Cultures of *Catharanthus Roseus*: Quantitation by Radioimmunoassay. *Phytochemistry* 17 (1978) 227 - 231.
- VADER, H.L., GEUSKENS, L.M., VINK, C.L.J.: Influence of Ions on the Antigen-Antibody Complex Formation as Measured by Radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta* 80 (1977) 361 - 372.
- VAN STEIRTEGHEM, A.C., ZWEIG, M.H., SCHECHTER, A.N.: Radioimmunoassay of Creatine Kinase Isoenzymes in Human Serum: Isoenzyme MM. *Clin. Chem.* 24 (1978) 414 - 421.
- VINING, L.C.: Effect of Tryptophan on Alkaloid Biosynthesis in Cultures of a *Claviceps* Species. *Can. J. Microbiol.* 16 (1970) 473 - 480.
- WACK, G., PERENYI, T., NAGY, C., UDVARDY, E., ZSOKA, E.: Verfahren zur Erhöhung der Alkaloidproduktion in submersen *Claviceps* Kulturen. *Deutsche Auslegeschrift* Nr. 1517851, 1975.
- WAGENER, C., BREUER, H.: Comparative Studies on the Radioimmunological Determination of Carcinoembryonic Antigen in Tumor Tissue. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16 (1978) 323 - 327.
- WAL, J.M., BORIES, G., MAMAS, S., DRAY, F.: Radioimmunoassay of Penicillloyl Groups in Biological Fluids. *FEBS Letters* 57 (1975) 9 - 13.
- WEILER, E.W.: Die radioimmunologische Bestimmung von Digoxin und verwandten Verbindungen in *Digitalis lanata* EHRH. Dissertation, Bochum 1977
- WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for the Determination of Free and Conjugated Abscissic Acid. *Planta* 144 (1979) 255 - 263.
- WEILER, E.W., WESTEKEMPER, P.: Rapid Selection of Strains of *Digitalis lanata* Ehrh. with High Digoxin Content. *Planta med.* 35 (1979) 316 - 322.
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Digoxin and Related Compounds in *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 15 (1976) 1537 - 1545.
- WIDE, L., PORATH, J.: Radioimmunoassay of Proteins with the Use of Sephadex-Coupled Antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 130 (1966) 257 - 260.
- WINGFIELD, J.C., FARNER, D.S.: The Determination of Five Steroids in Avian Plasma by Radioimmunoassay and Competitive Protein-Binding. *Steroids* 26 (1975) 311 - 327.
- WU, W., ROCKY, J.H.: Antivasopressin Antibody. Characterization of High-Affinity Rabbit Antibody with Limited Association Constant Heterogeneity. *Biochem.* 8 (1969) 2719 - 2728.

- YOUNG, J.D., KRAEGEN, E.W.: Simultaneous Assay of Insulin and Glukagon in Serum. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46 (1968) 697 - 705.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. In: Plant Tissue Cultures and Its Biotechnological Application. Barz, W., Reinhard, E., ZenK, M.H. (eds.). Springer. Berlin-Heidelberg-New York 1977. pp. 27 - 43

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk, der mir das Thema dieser Arbeit überließ, danke ich herzlich für sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine große Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen.

Ebenfalls danke ich Frau Beate Brämer für ihre sorgfältige technische Mithilfe.

LEBENS LAUF

Am 19. August 1952 wurde ich, Hans Arens, als Sohn des Schlossers Eduard Arens und seiner Ehefrau Hilde, geb. Arntz, in Gelsenkirchen geboren.

In den Jahren 1958 - 1962 besuchte ich die katholische Volksschule in Gelsenkirchen Hüllen und trat anschließend in das Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium in Gelsenkirchen ein, wo ich im Frühjahr 1971 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. Im November 1976 legte ich die Diplom-Hauptprüfung ab und begann im Dezember 1976 unter der Anleitung von Prof. Dr. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Seit Dezember 1976 habe ich eine Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie in Bochum inne.

